DIE UNTEREINHEITEN DER MITOCHONDRIALEN F_1 ATPase AUS NEUROSPORA CRASSA

Isolierung, chemische Charakterisierung und Stöchiometrie

Gerd Artur Wild

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0039

Aus dem Institut für
Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher, Prof. Dr. E. M. Klingenberg, Prof. Dr. F. Miller, Prof. Dr. H. G. Zachau

DIE UNTEREINHEITEN DER MITOCHONDRIALEN F_1 ATPase AUS NEUROSPORA CRASSA: ISOLIERUNG, CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG UND STÖCHIOMETRIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerd Artur Wild
aus Siegenburg

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter:..... Privatdozent Dr. W. Sebald

Mitberichterstatter:..... Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Dekan:..... Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:..... 3. Juli 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1975 bis Oktober 1978 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. Theodor Bücher und Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Walter Sebald.

Herrn Professor Bücher bin ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und die großzügige Förderung dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Sebald möchte ich für sein stetiges Interesse an der Arbeit, seinen Ratschlag und seine tatkräftige Unterstützung bei der Bewältigung praktischer und theoretischer Problemstellungen, vor allem aber für die entschlossene Erziehung zu eigenständigem und selbstkritischem wissenschaftlichen Denken und Arbeiten meinen aufrichtigen Dank bekunden.

Für die zahlreichen Gaben von Hydroxyapatit–Gel bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Privatdozent Dr. med. G. von Jagow.

Besonderer Dank gebührt weiterhin Frau Marlies Krammer für die Bereitstellung der Neurospora–Kulturen, Frl. Monika Kießling für die geschickte technische Assistenz bei der Präparation des Enzyms und Frl. Heidemarie Rothe für die Anfertigung der Photographien.

Diese Doktorarbeit sei auch eine dauernde und gute Erinnerung an Herrn Privatdozent Dr. med. Sigurd Werner, Herrn Dr. rer. nat. Elmar Wachter, Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Rainer Michel, Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Gerhard Hallermayer, Herrn Dr. rer. nat. Thomas Graf und Herrn Diplomchemiker Robert Werhahn. Sie alle haben mit freundschaftlicher Gesinnung und fruchtbaren Gesprächen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Eltern in Dankbarkeit zugeeignet

".... es kommt nicht darauf an, viel oder alles zu wissen, sondern die Grundsätze des Wissens, die Grundsätze der Wirklichkeit sich in jedem Gebiet zur Klarheit zu bringen und sie sich zugleich in einem konkreten Detail zu vergegenwärtigen".

JASPERS, 1967

INHALTSÜBERSICHT

Seite

1. EINLEITUNG.....1

2. FRAGESTELLUNG UND PLAN.....9

3. ERGEBNISSE.....11

3.1 Isolierung und Eigenschaften der F_1 ATPase.....11

3.1.1 Lösen der F_1 ATPase.....11

(1) Vorbemerkung.....11

(2) Anwendung von Ultraschall.....12

(3) Anwendung von Chloroform.....13

3.1.2 Reinigung der F_1 ATPase.....14

(1) Vorbemerkung.....14

(2) Chromatographie in DEAE–Cellulose.....14

(3) Filtration in BIOGEL A–0.5m.....15

(4) Gradienten–Elution über DEAE–Cellulose..20

(5) Ausbeute und Anreicherung von F_1 ATPase.21

3.1.3 Eigenschaften der isolierten F_1 ATPase.....22

(1) Allgemeine Eigenschaften.....22

(2) Untereinheiten–Zusammensetzung.....23

3.2 Isolierung der Untereinheiten der F_1 ATPase.....26

Vorbemerkung.....26

3.2.1 Trennung der großen Untereinheiten.....28

3.2.2 Isolierung der kleinen Untereinheiten.....31

(1) Trennung von γ und $\delta+\varepsilon$.....31

(2) Isolierung der γ Untereinheit.....36

(3) Trennung von $\delta+\varepsilon$.....37

3.2.3 Reinheit der isolierten Untereinheiten.....40

3.3 Chemische Charakterisierung der isolierten F_1 Untereinheiten.....42

(1) Aminosäure–Zusammensetzung.....42

Seite

(2) N–terminale Aminosäure.....44

3.4 Bestimmung der Stöchiometrie der F_1 Untereinheiten.....45

(1) Vorbemerkung.....45
(2) Ermittlung der molaren Relationen der F_1 Untereinheiten aus der Verteilung des Farbstoffes Coomassie Blau.....45
(3) Ermittlung der molaren Relationen der F_1 Untereinheiten aus der Verteilung einer [^{3}H]-Leucin–Markierung.....49

4. EXPERIMENTELLER TEIL.....52

4.1 Züchtung der Neurospora crassa–Hyphen.....52

(1) Arbeitsgang.....52
(2) Homogene Markierung des gesamten Zellproteins.....52

4.2 Präparation subzellulärer Fraktionen.....52

(1) Mitochondrien.....52
(2) Submitochondriale Membran–Partikel.....53

4.3 Lösen der F_1 ATPase.....53

(1) Behandlung submitochondrialer Membran–Partikel mit Ultraschall.....53
(2) Behandlung mitochondrialer Membranen mit Chloroform.....54

4.4 Reinigung der F_1 ATPase.....55

(1) Chromatographie in DEAE–Cellulose.....55
(2) Filtration in BIOGEL A–0.5m.....55
(3) Gradienten–Elution über DEAE–Cellulose.....56

4.5 Trennung der großen Untereinheiten.....56

(1) Dissoziation des Enzyms.....56

Seite

(2) Chromatographie in Hydroxyapatit.....57
(3) Volumen–Einengung durch Druck–Dialyse.....57

4.6 Isolierung der kleinen Untereinheiten.....57

(1) Dissoziation des Enzyms.....57
(2) Filtration in SEPHADEX G 100.....57
(3) Filtration in BIOGEL P 10.....58
(4) Filtration in SEPHADEX G 100.....58
(5) Filtration in BIOGEL P 30.....58

4.7 Analytische Verfahren.....59

(1) Protein–Bestimmung.....59
(2) ATPase–Test.....59
(3) $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophorese.....60
(4) Messung der Radioaktivität.....61
(5) Aminosäure–Analyse.....61
(6) Bestimmung der N–terminalen Aminosäure mit Hilfe der Dansyl–Methode.....62

4.8 Verwendete Materialien.....63

5. DISKUSSION.....64

5.1 Die Universalität der ATP–Synthetase.....64
5.2 Zur Dissoziation des ATPase Komplexes.....64
5.3 Allgemeine Charakterisierung der F_1 ATPase.....67
5.4 Dissoziation der löslichen ATPase und Isolierung ihrer Untereinheiten.....71
5.5 Zur Struktur der F_1 Untereinheiten.....74

6. ZUSAMMENFASSUNG.....79

7. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....81

8. LITERATURVERZEICHNIS.....82

1. EINLEITUNG

Bei der in der Zelle stattfindenden Energieumwandlung, d. h. bei der Umwandlung von Oxidations– bzw. Lichtenergie in ATP, nimmt der Enzymkomplex ATP–Synthetase eine zentrale Stellung ein. Die universelle Bedeutung dieses Enzyms für den zellulären Energiestoffwechsel zeigt sich darin, daß es in ähnlicher Form in der inneren Membran der Mitochondrien, in der Thylakoidmembran der Chloroplasten und im Plasmalemm der Bakterien angelegt ist (Übersicht bei [1]).

Das heute vorliegende, insbesondere während der letzten Jahre rasch angewachsene und vertiefte Wissen über das "vielleicht komplizierteste Enzym in energietransduzierenden Membranen" [2] ist weitgehend das Ergebnis zweier Forschungsrichtungen. Obwohl in Zielsetzung und Strategie unterschiedlich ausgerichtet, ergänzen sich die Untersuchungen über die Funktionsweise sowie Biogenese und Genetik des ATPase Komplexes in der Frage nach seiner molekularen Struktur in zunehmendem Maße.

(1) Im Hinblick auf die Funktionsweise der ATP–Synthetase wird heute allgemein das von P. MITCHELL konzipierte [3,4] und experimentell begründete [5] Modell vom reversibel arbeitenden Energietransformator anerkannt. Am Beispiel der in Mitochondrien stattfindenden oxidativen Phosphorylierung kann der Mechanismus der Energietransformation folgendermaßen formuliert werden: (a) Beim Übergang der Elektronen in der Atmungskette ($NADH \rightarrow NAD^+$) vom Zentrum des niedrigen (NADH–Q Reduktase) zu dem des hohen (Cytochrom c Oxidase) Redoxpotentials werden definierte Energiebeträge frei, mit deren Hilfe die Enzyme NADH–Q Reduktase, QH_2–Cytochrom c Reduktase und Cytochrom c Oxidase Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum des Organells transportieren (Prinzip der elektrogenen Protonenpumpen [6–8]). Auf diese Weise entsteht ein elektrochemisches Potential über der Innenmembran, das aus einem pH–Gradienten und einer Potentialdifferenz aufgebaut ist. (b) Getrieben von diesem elektrochemischen Potential,

fließen die Protonen durch den ATPase Komplex in den Matrixraum zurück [9–12], wobei sie, auf noch unbekannte Weise, in die, durch die lösliche ATPase (F_1) realisierte Bildung von ATP aus ADP und P_a eingreifen [13–15]. Nach MITCHELL [16] und HINKLE et al. [17] treibt die Oxidation von 1 Molekül NADH zu NAD^+ die Translokation von 6 H^+, von denen je 2 für die Synthese von 1 Molekül ATP erforderlich sind [16,18]. (c) Gemäß der Forderung MITCHELLs [3], kehrt sich die Transmission der Energie von der Atmungskette zur ATPase um, sobald diese nicht mehr ATP bildet (: ATP–Synthetase), sondern ATP zu ADP und P_a hydrolysiert (ATP–Phosphohydrolase oder kurz ATPase). Mit Hilfe der freigesetzten Hydrolyseenergie werden nun Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zurückgepumpt (: ATP–abhängige Protonenpumpe [3]; H^+ ATPase [19]), wobei sich durch Vergrößerung von pH–Gradient und Potentialdifferenz die Membran erneut auflädt [20–25]. Vermöge der Umkehrung des Elektronenflusses in der Atmungskette kann jetzt Substrat reduziert, bzw. ein anderer, ebenfalls energieabhängiger Prozeß, wie beispielsweise die Transhydrogenierung von NAD(H) zu NADP(H), realisiert werden [26–28].

Analog zu den Befunden bei Mitochondrien (Obersicht bei [29–35]) ist das Prinzip der Energietransmission (potentiell umkehrbarer Protonenfluß) und Energietransformation (reversibel arbeitende ATPase) auch in Chloroplasten (Obersicht bei [34,36,37]) und Bakterien (Obersicht bei [38–40]) verwirklicht. Im Falle der zuletzt genannten Organismen steht der ATPase Komplex sowohl im Dienste der Elektronen–Transport–Phosphorylierung als auch der aktiven Aufnahme von Stoffen; aerobe Vertreter, wie z. B. Escherichia coli, können für diesen Zweck Energie via Substrat–Oxidation (Atmungskette) und Hydrolyse von ATP (ATPase) in Form eines elektrochemischen Potentials bereitstellen [40,41]. Obligat anaerobe Bakterien (Streptococcus [42] und Clostridium [43,44]) hingegen vermögen den Gradienten wahrscheinlich nur mit Hilfe ihres ATP–spaltenden Enzyms aufzubauen: Die energietransduzierende ATPase der anaeroben Bakterien ist demnach als "Archetypus" des

in allen lebenden Organismen angelegten, zur Synthese/Hydrolyse von ATP und umkehrbaren H^+–Translokation befähigten Enzyms zu begreifen. Die entwicklungsgeschichtlich streng konservierten, weil zur Erfüllung dieser Funktionen notwendigen Strukturen werden im folgenden Abschnitt am Beispiel des mitochondrialen ATPase Komplexes (Übersicht bei [45–54]) referiert (vgl. hierzu Abb. 1).

(2) Die katalytischen Zentren für die Adeninnukleotide liegen im löslichen Anteil (: lösliche ATPase; F_1 ATPase; F_1) des ATPase Komplexes; dieser ist an der Matrixseite der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert und mit den von FERNANDEZ–MORAN [55,56] und RACKER [57] elektronenmikroskopisch beschriebenen sphärischen Partikeln identisch. Die F_1 ATPase wurde erstmals 1960 von PULLMAN et al. aus Rinderherz–Mitochondrien angereichert [58], und ihre wesentlichen Eigenschaften definiert [59]: Per se vermag das Protein die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_a zu katalysieren und ist, im Gegensatz zu anderen löslichen Enzymen, kältelabil. Nach Rekonstitution an F_1–defizienten mitochondrialen Membranen ist es kältestabil und realisiert die Phosphorylierung von ADP. Der Aufbau der mitochondrialen F_1 ATPase ist – ebenso wie der des korrespondierenden Enzyms aus Chloroplasten (Übersicht bei [1,48,60,61]) und Bakterien (Übersicht bei [1,63,64]) – überaus komplex: In der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophorese erscheinen 5 nicht–identische Banden mit Molekulargewichten von etwa 60 000 bis 8 000 Dalton; sie korrelieren mit den Untereinheiten–Polypeptiden des Enzyms und werden durch Konvention entsprechend zunehmender elektrophoretischer Mobilität mit α, β, γ, δ und ε bezeichnet. Ihre Stöchiometrie, d. h. die Frage, wieviele Exemplare von jeder Untereinheit im Enzym vorliegen, kann gegenwärtig nicht sicher entschieden werden. Möglicherweise sind die molaren Relationen der Untereinheiten nicht nur von der Art des Organismus, sondern auch von der Untersuchungsmethode abhängig [54,65]. Mit der löslichen mitochondrialen ATPase assoziiert ist ihr endogener Inhibitor, ein kleines, hitzestabiles Protein mit einem Mo-

lekulargewicht von etwa 10 000 Dalton (Übersicht bei [54]). Es hemmt spezifisch die enzymatische Aktivität der mitochondrialen ATPasen, nicht aber die Aktivität des homologen Enzyms aus Chloroplasten und Bakterien [66].

Weniger genau untersucht, weil schwer zu isolieren, ist die membran-integrierte Komponente F_0 des ATPase Komplexes, die aus extrem hydrophoben Polypeptiden (ihre Zahl wird mit

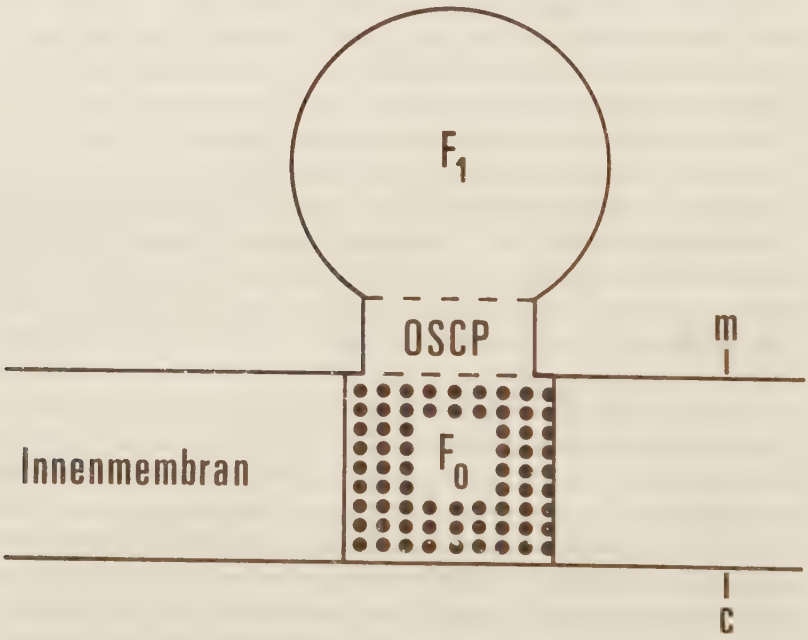

ABB. 1. Schematische Darstellung des mitochondrialen ATPase Komplexes. F_1: Sein löslicher Anteil. F_0: Sein membran-integrierter Sektor. OSCP: Das beide Komponenten verbindende Oligomycin-Sensitivity-Conferring-Protein. m,c: Die der Matrix bzw. dem Cytosol zugewandte Oberfläche der mitochondrialen Innenmembran.

2-4 angegeben [67]) und Phospholipid aufgebaut ist. Der Membransektor per se macht die mitochondriale Innenmembran für Protonen durchlässig, er hat also die Eigenschaften eines H^+

–Kanals [9–12,68,69]. Oligomycin [70,71] und Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD; [72]) – beides sind Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung – blockieren die H^+–Permeation, indem sie den Membransektor verändern [73,74]. SEBALD und WACHTER [75] vermochten am Beispiel des DCCD für Escherichia coli, Neurospora crassa und Saccharomyces cerevisiae zu zeigen, daß der Hemmstoff selektiv mit der 8 000–Dalton–Komponente des ATPase Komplexes durch kovalente Bindung an einen Glutaminsäurerest (N. cr., S. cer.) bzw. Asparaginsäurerest (E. coli) in Wechselwirkung tritt. Da dieses, auf Grund seiner Löslichkeit in neutralem Chloroform/Methanol auch "Proteolipid" [76] genannte (einen kovalent gebundenen Lipidanteil jedoch nicht enthaltende) Polypeptid sehr wahrscheinlich als Hexamer im ATPase Komplex vorliegt [77–80], irreversibel mit dem die Protonen–Permeabilität hemmenden DCCD reagiert und darüber hinaus in allen bislang untersuchten energietransduzierenden Membranen nachgewiesen werden kann [77–79,81–85], ist seine Beteiligung an der Bildung des Protonenkanals wenig zweifelhaft.

Will man die lösliche ATPase (F_1) mit dem Membransektor (F_0) zum kompletten Enzym (ATPase Komplex) rekonstituieren, so ist ein Protein erforderlich, das zuerst aus Rinderherz–Mitochondrien isoliert, und als "Oligomycin–Sensitivity–Conferring–Protein" (kurz OSCP) beschrieben wurde [86]. Dieser Terminus hat sich insofern als mißverständlich erwiesen, als das OSCP selbst keine Bindungsstelle für das Oligomycin enthält, dessen hemmenden Einfluß auf die enzymatische Aktivität der löslichen ATPase vielmehr dadurch ermöglicht, daß es diese mit dem Membransektor (er trägt den Wirkort des Oligomycins) verbindet. In der Ultrastruktur des ATPase Komplexes korrespondiert das 18 000 Dalton große, basische Polypeptid mit dem "Stiel", der zwischen Membran und F_1 sichtbar ist [56]. Ein Protein mit ähnlichen Eigenschaften wurde auch in Bakterien gefunden [87].

(3) Neben der bioenergetisch ausgerichteten Betrachtungsweise des ATPase Komplexes bemüht sich ein zweiter Zweig der

Forschung um die Aufklärung der Biogenese und genetischen Determination des Enzyms. Mitochondrien sind mit einer genetisch aktiven Duplex-DNA, sowie mit einem spezifischen, zur Proteinbiosynthese fähigen System (messenger-RNA, transfer-RNA, Ribosomen) ausgestattet, das zusammen mit dem kernabhängigen Syntheseapparat zur Bildung funktionsfähiger Organelle beiträgt [88-90]. Stellen die durch den Zellkern kodierten Translationsprodukte den größten Teil der mitochondrialen Matrix- und Innenmembranproteine sowie aller Außenmembranproteine bereit, so beschränkt sich der Beitrag des mitochondrialen Genoms auf nur wenige, durchweg hydrophobe Polypeptide, die fast ausschließlich als essentielle Bestandteile von Enzymen der Atmungskette (QH_2-Cytochrom c Reduktase und Cytochrom c Oxidase) sowie des ATPase Komplexes gefunden werden (Obersicht bei [2,67,91-95]).

Bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae beispielsweise sind 4 von 10 den ATPase Komplex bildenden Polypeptiden mitochondrialen Ursprungs, 6 Proteinbausteine hingegen entstammen dem cytoplasmatischen Syntheseapparat [77,96-99]. Auch im Falle des roten Brotschimmels Neurospora crassa müssen cytoplasmatisches und mitochondriales System kooperieren, wenn ein funktionstüchtiges Enzym entstehen soll. Anders als bei Hefe, werden jedoch nicht 4, sondern nur 2 des insgesamt aus 11 Protein-Untereinheiten aufgebauten ATPase Komplexes mitochondrial synthetisiert [100]. Eine Sonderstellung im Hinblick auf den Syntheseursprung der individuellen Polypeptide des ATPase Komplexes bei S. cer. und N. cr. nimmt die oben schon erwähnte DCCD-bindende Komponente ein, da sie in Brotschimmelzellen außerhalb [78], in Hefezellen hingegen innerhalb [101] der Mitochondrien gebildet wird. Dieser unterschiedliche Befund ist um so überraschender, als beide Proteine nicht nur ein und dieselbe Funktion erfüllen [80], sondern auch eine weitgehende Homologie in ihrer Primärstruktur aufweisen [102].

Die in den Mitochondrien synthetisierten Untereinheiten des ATPase Komplexes repräsentieren, entsprechend ihrem ho-

hen Gehalt an apolaren Aminosäuren, stark hydrophobe Proteine, d. h. sie sind unlöslich in Wasser und neigen leicht zur Bildung hoch-molekularer Aggregate, die nur in der Gegenwart starker ionischer Detergentien dispergieren [101]. Man hat aus dem hydrophoben Charakter bestimmter mitochondrialer Membranproteine ihre mit Notwendigkeit innerhalb des Organells stattfindende Synthese gefolgert, da die extramitochondriale Translation kaum mit dem naturgemäß erforderlichen Transport der Proteine durch das wäßrige Cytosol vereinbar erschien [2]. Der scheinbare Widerspruch löst sich auf mit der Vorstellung, daß hydrophobe, in das Organell zu importierende Komponenten in Form transportabler Polypeptide gebildet, und diese nach dem Erreichen ihres Funktionsortes in die Endprodukte umgewandelt werden. Einen gewichtigen Hinweis auf ein, eventuell in diesem Sinne wirksames Polypeptid konnten MICHEL et al. [103] am Beispiel des DCCD-bindenden Proteins aus Neurospora crassa erbringen: Die in vitro-Translation der gesamten cytoplasmatischen messenger-RNA ergab u. a. ein Syntheseprodukt, das nicht nur die vollständige Aminosäuresequenz der aus der Membran isolierbaren 8 000 Dalton großen ATPase-Untereinheit, sondern ein daran N-terminal gekoppeltes, etwa 35 Aminosäurereste umfassendes, Peptid enthielt. Eingedenk seines extrem hydrophoben Charakters (das Neurospora-Proteolipid enthält etwa 70% apolare Aminosäuren [104]) und seiner daraus resultierenden Neigung zur Aggregation, erscheint es realistisch, im in vitro-Produkt eine mögliche Transportform des Proteolipids, und in seiner Vorsequenz einen potentiellen Löslichkeitsvermittler zu erkennen.

Daß sich die Funktion einer Vorsequenz nicht allein darin erschöpfen muß, ein an sich hydrophobes Protein in einem wäßrigen Milieu zu lösen, d. h. transportfähig zu machen, sondern auch auf den Mechanismus erstrecken kann, der es cytoplasmatisch synthetisierten Polypeptiden beispielsweise erlaubt, die mitochondrialen Membranen zu "erkennen" und in diese integriert bzw. darüber hinweg transloziert zu werden, kann aus Untersuchungen von MACCECCHINI et al. [105] zum

Import von F_1-Untereinheiten in das Hefe-Mitochondrium geschlossen werden. In Ihren Experimenten wurden 3 der 5 kernkodierten Untereinheiten der löslichen ATPase, nämlich α, β und γ als (wahrscheinlich) N-terminal verlängerte Polypeptide an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet, in dieser Form zur mitochondrialen Innenmembran transportiert und dort durch Abspaltung der Vorsequenz in die assemblierfähigen Moleküle umgewandelt. Offenbar enthält die dem Cytosol zugwandte Oberfläche der Innenmembran eine Protease, die die Vorsequenz erkennt und abspaltet, so daß die zurückbleibende, nun "reife" Untereinheit auf Grund ihrer veränderten Konformation in das Organell aufgenommen werden kann (im Gegensatz zu den sekretorischen Proteinen [106] sind bei den importierten Organellenproteinen Transport und Aufnahme zeitlich und räumlich getrennt: Posttranslationaler(s) Transport und Prozessieren [107]).

Wenig aufgeklärt ist die, im Hinblick auf die komplexe Struktur der mitochondrialen ATPase mit Notwendigkeit sich schrittweise vollziehende Assemblierung der einzelnen Untereinheiten zum funktionsfähigen Enzym. Kinetische Experimente weisen darauf hin, daß der geordnete Zusammenbau des Enzyms aus den an cytoplasmatischen bzw. mitochondrialen Ribosomen (in Form von Praekursoren?) synthetisierten Polypeptiden über Intermediate führt, die als teil-assemblierte Untereinheiten interpretiert werden können (Obersicht bei [67]).

2. FRAGESTELLUNG UND PLAN

Die strukturelle Charakterisierung der ATPase energietransduzierender Membranen im Sinne eines amphipathischen Proteinkomplexes mit einer hydrophilen (F_1) und einer hydrophoben (F_0) Komponente ist das gemeinsame Ergebnis der bioenergetischen und biogenetischen Forschung. Im Hinblick auf die Komplexität des Enzyms ist es nötig, die Erweiterung und Vertiefung des Wissens auf diesen beiden Gebieten auf eine, über das Niveau von F_1–F_0 hinausgehende Ausarbeitung seiner Struktur zu gründen, d. h., den Komplex in seine Untereinheiten zu zerlegen und diese genau zu untersuchen.

In diesen allgemeinen Rahmen gestellt, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, (1) die individuellen Untereinheiten der mitochondrialen F_1 ATPase aus dem roten Brotschimmel Neurospora crassa zu isolieren und (2) ihre erste Charakterisierung, speziell die Bestimmung ihrer molaren Relationen, vorzunehmen.

Neurospora–Mitochondrien enthalten, ebenso wie die korrespondierenden Organelle anderer Organismen, eine kompliziert gebaute ATPase (Übersicht bei [67]), deren Aktivität durch Oligomycin [108] und DCCD [80] hemmbar ist, und die in der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophorese 11 distinkte Banden aufweist, von denen 5 mit den Untereinheiten ihrer löslichen Komponente (F_1) korrelieren [100].

(1) Im Vordergrund der Planung zur Anreicherung dieser Untereinheiten–Polypeptide stand weniger ihre funktionelle Intaktheit als ihre Reinheit, da es im Rahmen weiterführender Experimente vorgesehen war, ihre Antikörper (als geeignetes Werkzeug für die Bearbeitung biogenetischer Problemstellungen) zu gewinnen. Die Isolierung der Untereinheiten der F_1 ATPase erforderte es zunächst einmal, diese mit Hilfe eines geeigneten Verfahrens von der inneren Mitochondrienmembran abzulösen, in größerem Maßstab zu reinigen und an Hand vergleichbarer Kriterien (spezifische Enzymaktivität, Bandenmuster in der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophore-

se, Aminosäure-Zusammensetzung) als lösliche ATPase zu kennzeichnen. Erleichtert wurde die Enzympräparation durch den Umstand, daß der Pilz Neurospora crassa (ein Eukaryont mit hoher biosynthetischer Aktivität) in großen Mengen in submerser Kultur gezüchtet werden kann (die Verdoppelungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase beträgt 2–4 Stunden), für sein Wachstum nur ein einfaches Salzmedium mit Zucker als einzige Kohlenstoffquelle erfordert, und seine Mitochondrien unter relativ schonenden Bedingungen in großer Ausbeute zu isolieren sind [109–112]. Als Ausgangsmaterial für die Anreicherung der Untereinheiten diente das mit Hilfe von $NaDodSO_4$ dissoziierte Enzym. Das Wanderungsverhalten der Untereinheiten in der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid-gel Elektrophorese legte im Hinblick auf möglichst hohe Proteinausbeuten im mg-Bereich die Anwendung verschiedener säulen-chromatographischer Verfahren nahe.

(2) Entsprechend einer gängigen, in der Literatur beschriebenen Methode können die molaren Relationen der Untereinheiten aus ihren relativen Farbintensitäten im $NaDodSO_4$/Polyacrylamid-gel berechnet werden. Unabhängig von diesem Verfahren sollte die Untereinheiten-Stöchiometrie aus der Verteilung einer [^{3}H]Leucin-markierten F_1 ATPase im $NaDodSO_4$/Polyacrylamid-gel ermittelt werden. Unter Einbeziehung des Leucingehaltes des Enzyms und seiner Untereinheiten sollte es möglich sein, ihre wahren Proteinanteile zu bestimmen. Wesentlich in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß im Falle von Neurospora crassa die Markierung der Zellproteine mit [^{3}H]Leucin einfach vorzunehmen ist, indem die radioaktive Aminosäure direkt in das Kulturmedium gegeben werden kann, und von den Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase schnell und quantitativ aufgenommen wird, ohne daß eine Reutilisation stattfindet [113,114].

3. ERGEBNISSE

3.1 ISOLIERUNG UND EIGENSCHAFTEN DER F_1 ATPase

3.1.1 LÖSEN DER F_1 ATPase

(1) VORBEMERKUNG. Die F_1 ATPase ist fest mit dem membranintegrierten Sektor F_0 des ATPase Komplexes verbunden. Als seine hydrophile Komponente ist sie wasserlöslich, sobald dieser in F_0 und F_1 gespalten wird [58]. Die Wasserlöslichkeit ist insofern eine wesentliche Eigenschaft, als sie die Anreicherung bzw. Reindarstellung des Enzyms in nativer Form mit Hilfe konventioneller Methoden (wie z. B. Fraktionierung durch Ammoniumsulfat; Chromatographie im Ionenaustauscher u. Molekularsieb) erlaubt. Hydrophobe Proteine hingegen können nur schwer in nativem Zustand gewonnen werden, weil ihre Anreicherung per definitionem die Anwesenheit eines Detergens erfordert [52,69,115–117].

Das Lösen der mitochondrialen F_1 ATPase ist prinzipiell durch mechanische oder chemische Desintegration der mitochondrialen Innenmembran möglich. Eine mechanische Desintegration wird beispielsweise erreicht, wenn man die Membranen in Gegenwart von Glaskügelchen heftig schüttelt [58,118] oder mit Ultraschall behandelt (Obersicht in [110]). BEECHEY et al. [119] haben ein Verfahren beschrieben, dem zufolge die F_1 ATPase in Lösung geht, wenn die Membranlipide mit einem organischen Lösungsmittel, wie z. B. Chloroform, (teilweise) vom Protein separiert werden.

Das Lösen der F_1 ATPase mit Hilfe von Ultraschall bzw. Chloroform wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erprobt und modifiziert, mit dem Ziel, größere Mengen eines funktionell und strukturell intakten Enzymproteins zu gewinnen. Obwohl deutlich verschieden im Hinblick auf ihre Praktikabilität und die Masse des in Lösung gebrachten Proteins, erwiesen sich im Falle von Neurospora crassa beide Verfahren als geeignet für die Solubilisierung von F_1. In Abbildung 2 ist die Anwendung von Ultraschall bzw. Chloroform skizziert.

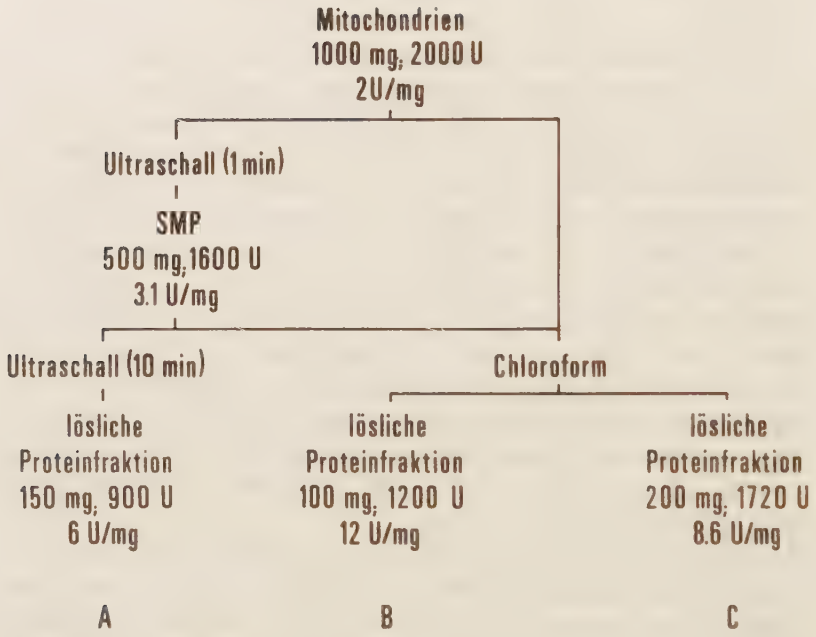

ABB. 2. Übersicht über die Herstellung einer löslichen, ATPase-Aktivität enthaltenden Proteinfraktion durch (A) Behandlung submitochondrialer Partikel mit Ultraschall oder (B) Chloroform bzw. (C) ganzer Mitochondrien mit Chloroform. Die aus einer Reihe repräsentativer Präparationen gemittelten u. standardisierten Zahlen orientieren über Ausbeute (U) und Anreicherung (U/mg) des Enzyms. Die Proteinbestimmung wurde nach LOWRY et al. [123], die Messung der enzymatischen Aktivität nach dem im experimentellen Teil beschriebenen ATPase-Test durchgeführt.

(2) ANWENDUNG VON ULTRASCHALL. Das Lösen von F_1 mit Hilfe von Ultraschall wurde in Anlehnung an ein für Rinderherz [120] und Rattenleber [121] erarbeitetes Verfahren durchgeführt, die submitochondrialen Membranpartikel (SMP) jedoch nicht, wie beschrieben [120], für mehrere Stunden (in der Regel übernacht) bei alkalischem pH (9.2) inkubiert.

Durch Beschallen der SMP bei pH 8.5 mit einer Frequenz von 10–20 kHz und einer maximalen Intensität von 75 W/cm^2 konnte

die F_1 ATPase von der Innenmembran abgelöst werden. Da sich die Intensität (I) zum Abstand (d) zwischen Schallquelle und Partikel sowie zur Viskosität der Partikelsuspension (a) entsprechend

$$I = I_0 e^{-2ad} \quad [122]$$

verhält, wurde das zu beschallende Volumen auf 100 ml beschränkt, und eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml gewählt.

Die Untersuchung des Einflusses der Beschallungsdauer auf die Ausbeute an gelöster ATPase ergab, daß (unter den oben genannten Bedingungen) bereits nach einer Beschallungszeit von 7.5 Minuten etwa 50% der eingesetzten ATPase-Aktivität in der löslichen Proteinfraktion enthalten war, und durch Fortführung der Beschallung dieser Betrag nicht mehr gesteigert werden konnte.

Nach Entfernung der Membranfragmente durch isoelektrische Präzipitation bei pH 5.4 und Zentrifugation [58] enthielt der Überstand in der Regel 50% der partikulären ATPase-Aktivität sowie 30% des eingesetzten Gesamtproteins. Bezieht man die spezifische Aktivität der gelösten Proteinfraktion auf die der submitochondrialen Partikel, so resultiert eine Anreicherung um den Faktor 2 (vgl. hierzu Abb. 2).

(3) ANWENDUNG VON CHLOROFORM. Die Extraktion der F_1 ATPase mit Chloroform wurde zunächst gemäß der von BEECHEY et al. [119] beschriebenen Prozedur auf submitochondriale Membranpartikel angewendet. Eine Suspension hiervon wurde bei Raumtemperatur [58] mit einem gleichen Volumen Chloroform solange (3–5 Minuten) geschüttelt, bis sich eine homogene Emulsion bildete. Durch Zentrifugation gewannen wir daraus die wasserlösliche Proteinfraktion in Form eines gelb-farbenen Überstandes; unlösliches Material reicherte sich in einer Interphase an. Der Überstand umfaßte etwa 20% des Proteins sowie 80–90% der enzymatischen Aktivität der submitochondria-

len Partikel, entsprechend einer etwa 4–fachen Anreicherung. Zu gleichen Anteilen konnten Protein und Aktivität erhalten werden, sobald anstelle der Partikel ganze Mitochondrien mit Chloroform ausgeschüttelt wurden (vgl. hierzu Abb. 2).

3.1.2 REINIGUNG DER F_1 ATPase

(1) VORBEMERKUNG. Die Analyse der durch Anwendung von Ultraschall (SMP) bzw. Chloroform (SMP, Mitochondrien) in Lösung gebrachten Proteinfraktion mit Hilfe der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophorese erbrachte Bandenmuster, die die Untereinheiten der F_1 ATPase vollständig enthielten: Im Falle von Neurospora crassa ist es demnach möglich, unabhängig von der Methode ein und dieselbe ATPase zu lösen. Da mit der Anwendung von Chloroform auf ganze Mitochondrien die Präparation der Partikel eingespart, und darüber hinaus die membrangebundene ATPase–Aktivität fast quantitativ erhalten werden konnte, lag es – im Hinblick auf die Isolierung großer Mengen von Enzymprotein – nahe, die in Abbildung 2 skizzierten Wege (A) und (B) zu Gunsten von (C) zu verlassen.

(2) CHROMATOGRAPHIE IN DEAE–CELLULOSE. Abbildung 3 zeigt die gel–elektrophoretische Auftrennung einer durch Chloroformbehandlung aus Mitochondrien gewonnenen löslichen Proteinfraktion vor (a) und nach (b) Chromatographie in DEAE–Cellulose. Mit einer 300 mM KCl–Lösung (in TEA) wurde das in (b) dargestellte Protein eluiert. Es enthielt in der Regel mehr als 90% der auf die Säule aufgetragenen enzymatischen Aktivität und etwa 30% des mit Chloroform extrahierten mitochondrialen Proteins.

Ein Vergleich der in (a) und (b) gezeigten Bandenmuster demonstriert, daß die hohe ($\sim$ 3.5–fache) Anreicherung der F_1 ATPase nach Chromatographie in DEAE–Cellulose weniger durch die Elimination einzelner Proteinkomponenten, sondern mehr durch die gleichmäßige Verminderung des gesamten Proteins zustande gekommen ist. Dies gilt in gleicher Weise für das Enzym selbst, da sich die Farbintensität der Untereinheiten im $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel nach diesem Schritt genau so ver-

hielten wie im Chloroform–Extrakt. Die Bedeutung dieses Sachverhaltes ist insofern wesentlich, als auch im umgekehrten Falle (z. B. Verminderung oder Verlust einer oder mehrerer Untereinheiten durch Adsorption an das Gel) die Enzympräparation nach weiterer Reinigung als homogen betrachtet worden wäre, die molaren Relationen der Untereinheiten aber nicht mehr jenen, im ursprünglichen, membran–assoziierten Enzym vorliegenden, entsprochen hätten.

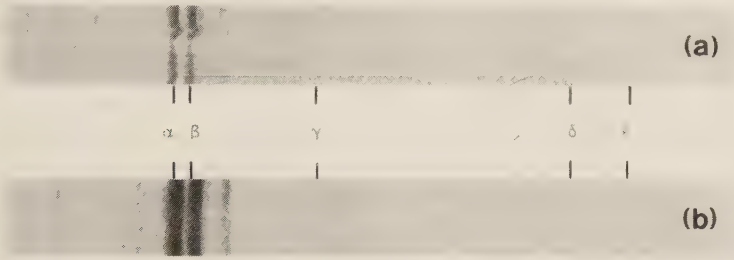

ABB. 3. Bandenmuster einer mit Chloroform aus Mitochondrien extrahierten, löslichen Proteinfraktion vor (a) und nach (b) Chromatographie in DEAE–Cellulose. Je 20 µg Protein wurden in einem 12.5%igen Polyacrylamid–gel in Gegenwart von NaDod-SO_4 aufgetrennt, und die Proteinbanden mit Coomassie Blau angefärbt. α, β, γ, δ und ε bezeichnen die Untereinheiten der löslichen ATPase (F_1).

(3) FILTRATION IN BIOGEL A–0.5m. Durch Filtration in BIOGEL A–0.5m wurde die spezifische Aktivität der nach Ionenaustauscher–Chromatographie erhaltenen Enzymlösung verdoppelt, und der vom Beginn der Präparation an vorhandene farbgebende Anteil (er ist in Abb. 4 mit C bezeichnet) von der F_1 ATPase abgetrennt (die Natur dieses gelb–roten Farbstoffes wurde nicht näher untersucht, wahrscheinlich handelt es sich um Carotinoide, die bei Neurospora crassa hauptsächlich in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert sind [124]).

Die Verteilung der enzymatischen Aktivität der F_1 ATPase über die gesammelten Fraktionen, und das bei 280 nm kontinuierlich registrierte Proteinprofil ist in Abbildung 4 dar-

gestellt. Da die Kurven von Aktivität und Protein zusammenfielen, ohne (wie es bei einer Molekularsieb-Chromatographie zu erwarten ist) symmetrisch angeordnet zu sein, wurde geprüft, ob dieses Verhalten ursächlich durch technische Umstände (inhomogen gepackte Säule, unsauberer Auftrag der Probe) oder aber durch die Inhomogenität des Enzymproteins bedingt worden war (eine Verzerrung des Gipfels B auf Grund seines Erscheinens nahe dem durch A markierten vorderen Ausschluß der Säule scheidet aus, da beide basis-getrennt sind).

Die Analyse des Proteins einzelner Gipfelfraktionen (a-d) mit Hilfe der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid-gel Elektrophorese zeig-

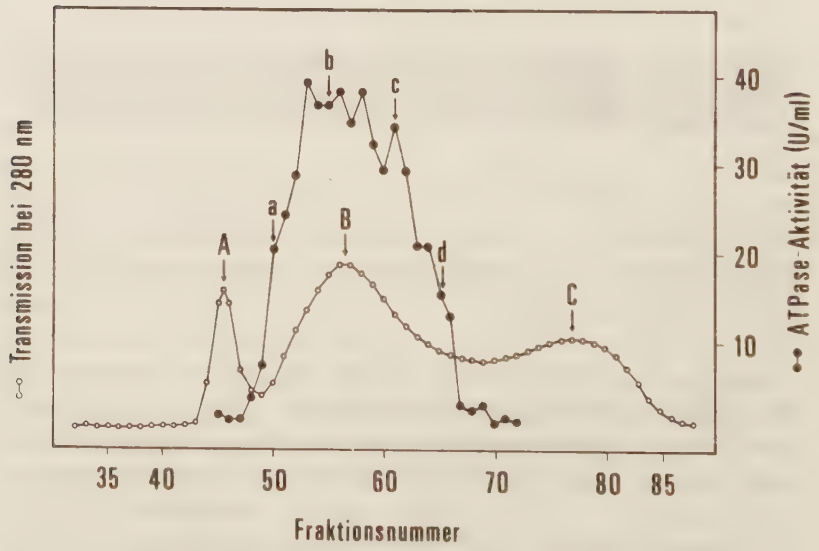

ABB. 4. Chromatographie der löslichen Proteinfraktion nach DEAE-Cellulose in einer Säule von BIOGEL A-0.5m (Abmessungen: 150 X 3 cm; Durchfluß: ∿ 10 ml/Fraktion). ●-●: Verteilung der enzymatischen Aktivität. O-O: Im Durchflußphotometer bei 280 nm aufgenommenes Proteinprofil. A: Im vorderen Ausschluß wanderndes, nicht näher bestimmtes Material. B: Lösliche ATPase. C: Carotinoide (?). a, b, c und d kennzeichnen Fraktionen, die mit Hilfe der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid-gel Elektrophorese analysiert wurden.

te, daß das späte Eluat des abfallenden Schenkels eine in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung unvollständige und, im Vergleich zu dem im ansteigenden Schenkel und im Plateau der Aktivitätskurve eluierten Protein, verunreinigte, lösliche

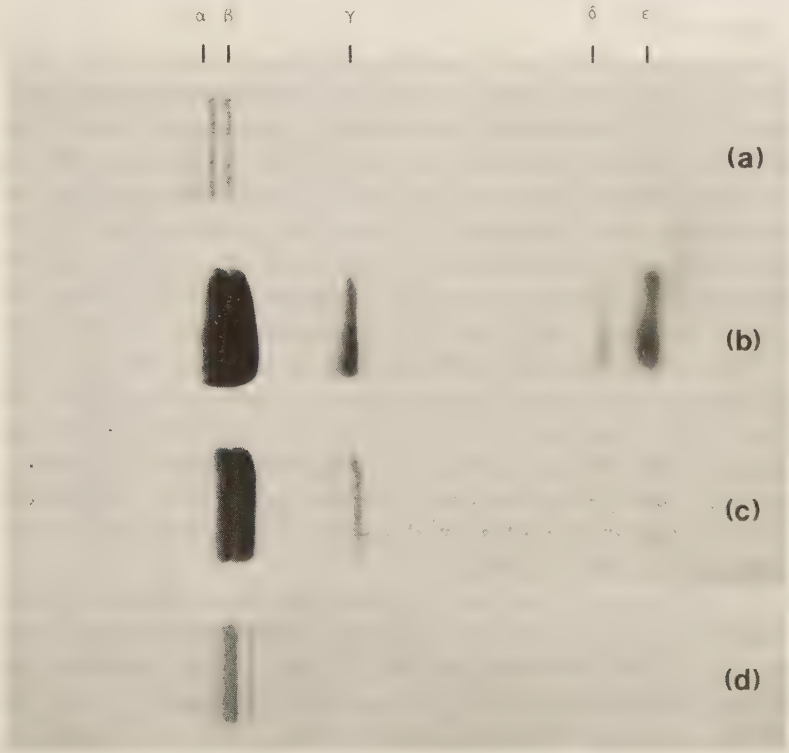

ABB. 5. Analyse des Proteins der in Abbildung 4 mit a, b, c, d bezeichneten Fraktionen. Von jeder Fraktion wurden 15 µl (entsprechend 5–25 µg Protein) entnommen, mit 5 µl eines NaDodSO$_4$-haltigen Puffers gemischt, und das dissoziierte Protein in einem 12.5%igen Polyacrylamid-gel in Gegenwart desselben Detergens aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie Blau sichtbar gemacht. α, β, γ, δ und ε bezeichnen die Untereinheiten der reinen, löslichen ATPase.

ATPase enthielt. Das in Abbildung 5 mit (d) bezeichnete Bandenmuster demonstriert, daß die Veränderungen vorwiegend die beiden großen F_1–Untereinheiten betrafen: Anstelle von α erscheinen 2 dicht beieinander liegende Polypeptide; die elektrophoretische Mobilität der β Untereinheit ist leicht erhöht, ihre Anfärbbarkeit mit Coomassie Blau im Vergleich zu α reduziert.

MICHEL et al. [125] konnten für Neurospora crassa nachweisen, daß bei der Präparation der Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation Proteasen co–sedimentieren, die in cytosolischen Vesikeln lokalisiert sind und ihre Wirkung entfalten, sobald die Vesikel während der Aufarbeitung der Mitochondrien (Ultraschall, Chloroform, Detergentien) eröffnet werden. Im Lichte dieser Untersuchungen scheint die Alteration des Enzymproteins das Ergebnis proteolytischer Aktivität zu sein. Daß sich diese hauptsächlich während der Filtration des Enzyms in BIOGEL A–0.5m manifestierte, kann aus Beobachtungen geschlossen werden, denen zufolge die lösliche ATPase bei gel–elektrophoretischer Analyse nach Chromatographie im Anionenaustauscher regelmäßig eine strukturell intakte α und β Untereinheit enthielt, und nach dem BIOGEL eine (α) dieser Proteinkomponenten häufig vermindert war bzw. gelegentlich völlig fehlte.

Da die Vesikel im Wechsel von Wärme und Kälte zerreißen [110,125], wurden die Mitochondrien grundsätzlich aus vorher bei −18 °C eingefrorenen Hyphen isoliert. Das komplette Untereinheitenmuster der F_1 ATPase wurde jedoch nur dann erhalten, wenn die Mitochondrien in Gegenwart des Proteasen–Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) präpariert wurden. Nach Filtration des Enzyms in BIOGEL A–0.5m wurden nur die Fraktionen mit hoher ATPase–Aktivität vereinigt, so daß eine Kontamination mit (eventuell) angedautem Material vermieden, und damit eine (in Grenzen) homogene Präparation gewonnen werden konnte. Bandenmuster und Pherogramm einer F_1 ATPase nach Chromatographie in BIOGEL A–0.5m sind in Abbildung 6 dargestellt. α, β, γ, δ und ε bezeichnen die Unter-

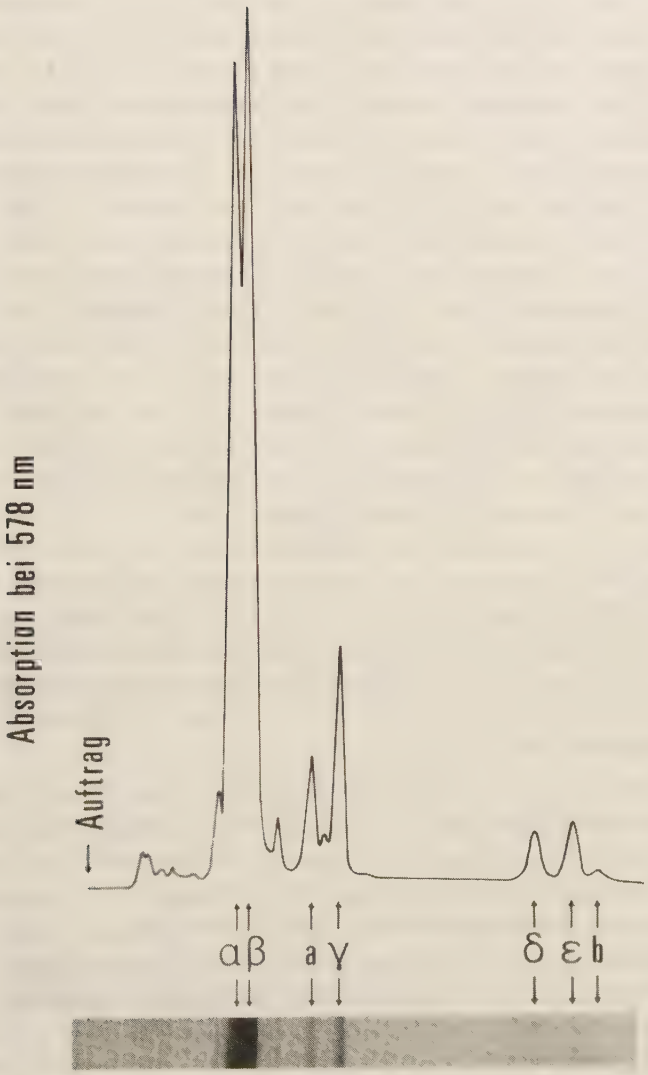

ABB. 6. Bandenmuster und Pherogramm der F_1 ATPase nach Filtration in BIOGEL A—0.5m. 20 µg Protein wurden in einem 12.5 %igen Polyacrylamid—gel in Gegenwart von $NaDodSO_4$ getrennt, und die mit Coomassie Blau gefärbten Banden bei 578 nm densitometriert. Die Bezeichnungen werden im Text erläutert.

einheiten des reinen Enzyms. Ermittelt man ihren Anteil an der durch den Kurvenzug begrenzten Fläche, so resultiert ein Reinheitsgrad von etwa 95%. Die Restfläche von 5% verteilt sich auf Verunreinigungen, die entweder auf Grund einer besonderen Affinität zur F_1 ATPase oder durch ähnliches chromatographisches Verhalten weder im Anionenaustauscher noch im Molekularsieb von dieser abgetrennt wurden. Über die Natur dieser Polypeptide ist nichts bekannt, abgesehen von der mit b bezeichneten Bande, die (wahrscheinlich) das endogene Inhibitorprotein der löslichen ATPase repräsentiert (JACKL [126] isolierte mit Hilfe der von HORSTMAN et al. [127] angegebenen Methode aus Neurospora crassa ein Protein, das die ATPase-Aktivität submitochondrialer Partikel dosis-abhängig hemmte und in seinem Molekulargewicht (~ 10 000 Dalton) gut mit dem korrespondierenden Polypeptid aus Chloroplasten [66] und Rinderherz [128] übereinstimmt).

Die Bande a erschien im NaDodSO$_4$-gel nur dann, wenn das Enzym mit Chloroform aus submitochondrialen Partikeln oder ganzen Mitochondrien extrahiert, nicht aber, wenn es mit Hilfe von Ultraschall in Lösung gebracht worden war. TAKESHIGE et al. [129] fanden in der chloroform-solubilisierten Hefe-ATPase ebenfalls ein Polypeptid mit vergleichbarem (~ 40 000 Dalton) Molekulargewicht.

(4) GRADIENTEN-ELUTION ÜBER DEAE-CELLULOSE. Die genannten Verunreinigungen konnten aus dem Enzym entfernt werden, wenn das Protein nach BIOGEL A-0.5m mit einem linearen KCl-Gradienten über DEAE-Cellulose eluiert wurde. Die enzymatisch aktivsten Fraktionen wurden, wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, bei einer KCl-Konzentration von 150-180 mM erhalten. Da mit diesem Reinigungsschritt nur etwa 5% Fremdprotein abgetrennt wurden, scheint die Steigerung der spezifischen Aktivität der ATPase von durchschnittlich 60 U/mg auf 70-80 U/mg mit dem Fortfall der Wirkung des endogenen Inhibitors zu korrelieren (dieser reagiert in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP mit der löslichen ATPase zu einem stabilen Komplex, der u. a. bei Anwesenheit von Salz und EDTA dissoziiert [130]).

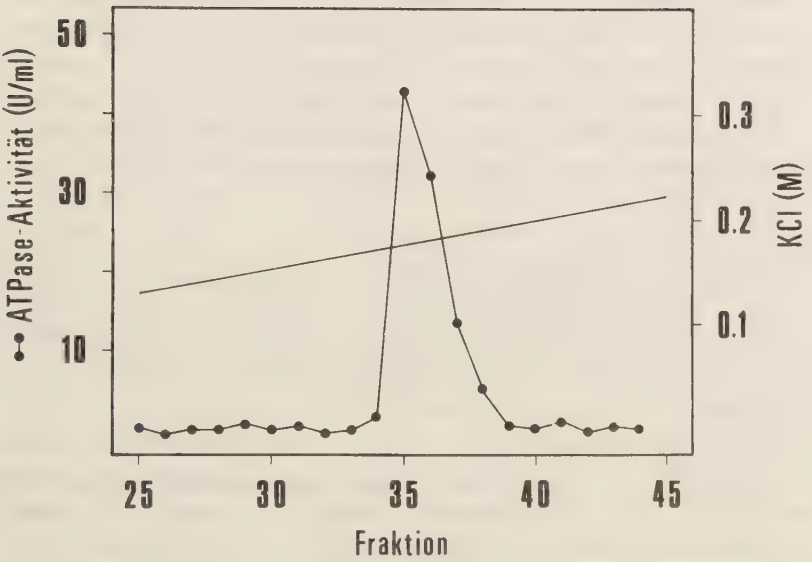

ABB. 7. Elution der F_1 ATPase mit einem von 0—300 mM linear ansteigenden KCl—Gradienten über einer Säule von DEAE—Cellulose (Abmessungen: 12 X 1.6 cm; Durchfluß: 7 ml/Fraktion und 20 Minuten). Die verteilung der ATPase über die gesammelten Fraktionen wurde an Hand ihrer enzymatischen Aktivität ermittelt.

(5) AUSBEUTE UND ANREICHERUNG VON F_1 ATPase. Ausbeute und Anreicherung einer mit Hilfe von Chloroform aus ganzen Mitochondrien extrahierten und durch Chromatographie in DEAE—Cellulose sowie in BIOGEL A—0.5m gereinigten F_1 ATPase sind in Tabelle I zusammengestellt. Die Werte demonstrieren, daß die Anwendung von Chloroform als lösendes Agens in Kombination mit dem Anionenaustauscher und dem Molekularsieb ein geeignetes Verfahren zur Präparation von großen Mengen einer strukturell und funktionell intakten F_1 ATPase ergibt: Aus 5 g Mitochondrien z. B. können durchschnittlich 100 mg Enzymprotein mit dem in Abbildung 6 beschriebenen Reinheitsgrad und einer spezifischen Aktivität von 60—80 U/mg gewonnen wer-

den. Berücksichtigt man den, durch die Nachreinigung des Enzyms über DEAE–Cellulose entstandenen Verlust von in der Regel 50% des auf die Säule gegebenen Proteins (es wurden nur die enzymatisch aktivsten Fraktionen vereinigt), so beträgt die Ausbeute immer noch 1% des gesamten mitochondrialen Proteins und 30–40% der membran–gebundenen ATPase–Aktivität.

TABELLE I

AUSBEUTE UND ANREICHERUNG VON F_1 ATPase WÄHREND DER REINIGUNG

Die Proteinbestimmung wurde nach LOWRY et al. [123], und die Messung der enzymatischen Aktivität nach dem im experimentellen Teil beschriebenen ATPase–Test mit ATP als Substrat ausgeführt

Schritt	Volumen (ml)	Gesamt-Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)
Mitochondrien	500	5000	10500	2.1
Wässrige Phase nach Chloroform-Behandlung	400	1180	10200	8.6
DEAE-Cellulose Chromatographie	50	330	9760	29.6
BIO-GEL A-0.5m Chromatographie	70	120	7200	60.0

3.1.3 EIGENSCHAFTEN DER ISOLIERTEN F_1 ATPase

(1) ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN. Die spezifische Aktivität der löslichen ATPase variierte in Abhängigkeit von dem Gehalt an endogenem Inhibitorprotein und dem Ausmaß seiner Entfernung während der Anreicherung des Enzyms zwischen 60–80 U/mg. Einen vergleichbaren Wert berichtet JACKL [126] von einer Neurospora–ATPase, die gemäß der von SENIOR et al. [120] beschriebenen Methode isoliert wurde.

In Gegenwart von 1 mM EDTA und 2 mM ATP war eine Enzymlösung mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml bei Raumtemperatur bis zu 48 Stunden stabil; sie verlor innerhalb von 2 Stunden 60% ihrer Aktivität, wenn sie einer Temperatur von 0 ^{o}C ausgesetzt wurde. Durch Zusatz von 20% Methanol (v/v) waren (auch bei Abwesenheit von ATP) sowohl bei Raumtemperatur als auch in Kälte für 2 Tage gleichbleibende Aktivitätsspiegel meßbar. Wurde das Enzym in Gegenwart der eben genannten Liganden mit Ammoniumsulfat in einer Endkonzentration von 70% präzipitiert, so konnte es ohne Verlust von Funktion und Struktur für Monate bei 4 ^{o}C aufbewahrt werden.

(2) UNTEREINHEITEN–ZUSAMMENSETZUNG. F_1 ATPase wurde durch $NaDodSO_4$ dissoziiert und in Gegenwart desselben Detergens in einem Polyacrylamid–gel in ihre Proteinkomponenten getrennt. In der Abbildung 8 sind Bandenmuster und Pherogramm des reinen, durch Gradienten–Elution über DEAE–Cellulose erhaltenen Enzyms dargestellt: Es ist aus 5 verschiedenen Polypeptiden aufgebaut, wenn man unterstellt, daß jede, im Gel sichtbare, Bande nur eine Proteinspezies mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 59 000 (α), 56 000 (β), 36 000 (γ), 15 000 (δ) und 12 000 (ε) Dalton enthält. Entsprechend der Verteilung des Farbstoffes Coomassie Blau umfassen die beiden großen Untereinheiten (α+β) etwa 85% des Enzymproteins, während auf die kleinen Untereinheiten 10% (γ) bzw. 2.5% (δ,ε) entfallen.

In denselben quantitativen Relationen liegen die F_1-Untereinheiten im ATPase Komplex vor. Immunpräzipitiert man diesen mit Hilfe eines F_1–Antikörpers aus Triton X 100–solubilisierten Mitochondrien und trennt ihn im $NaDodSO_4$–gel auf, so erscheinen nach Färbung 13 Banden mit scheinbaren Molekulargewichten von 60 000–8 000 Dalton. Durch Einbau einer radioaktiv markierten Aminosäure in den Komplex können diese Proteinkomponenten ebenfalls dargestellt und mit denen des Pherogramms korreliert werden. Die Polypeptide mit Molekulargewicht 59 000, 56 000, 36 000, 15 000 und 12 000 Dalton entsprechen im Densitogramm und in der Radioaktivitäts–Verteilung den 5 Untereinheiten der löslichen ATPase (vgl. Abb. 9).

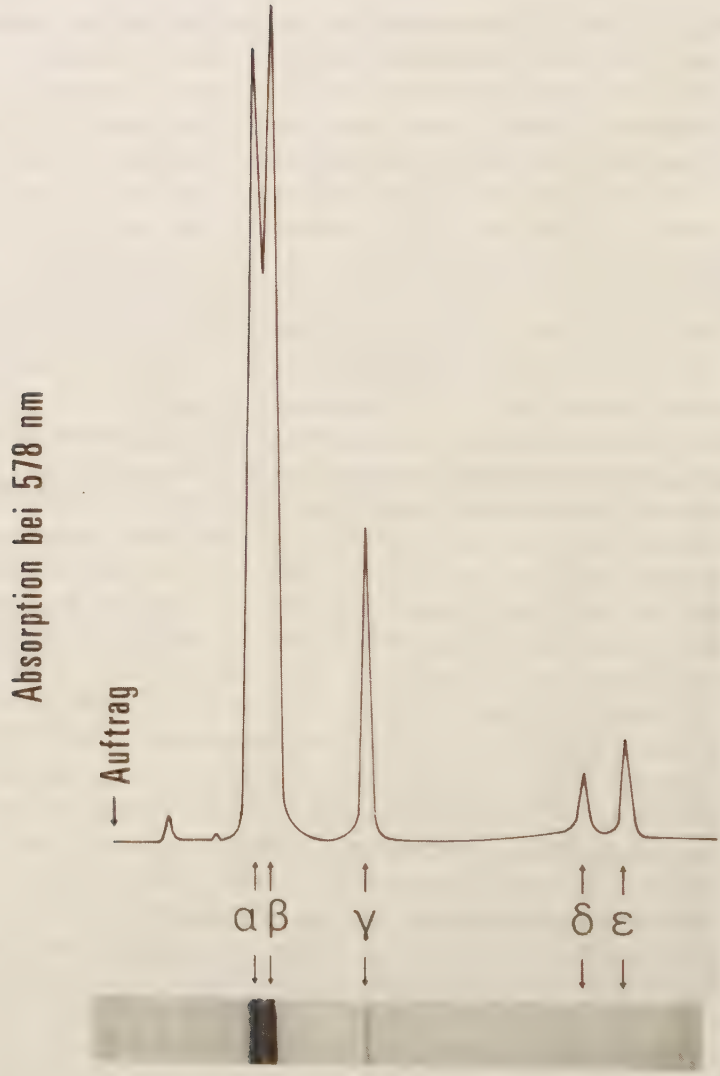

ABB. 8. Untereinheiten-Zusammensetzung der reinen F_1 ATPase. 20 µg Enzymprotein wurden in einem 12.5%igen Polyacrylamid-gel in Gegenwart von NaDodSO$_4$ aufgetrennt, und die mit Coomassie Blau gefärbten Banden bei 578 nm densitometriert. α, β, γ, δ und ε benennen die Untereinheiten der reinen ATPase.

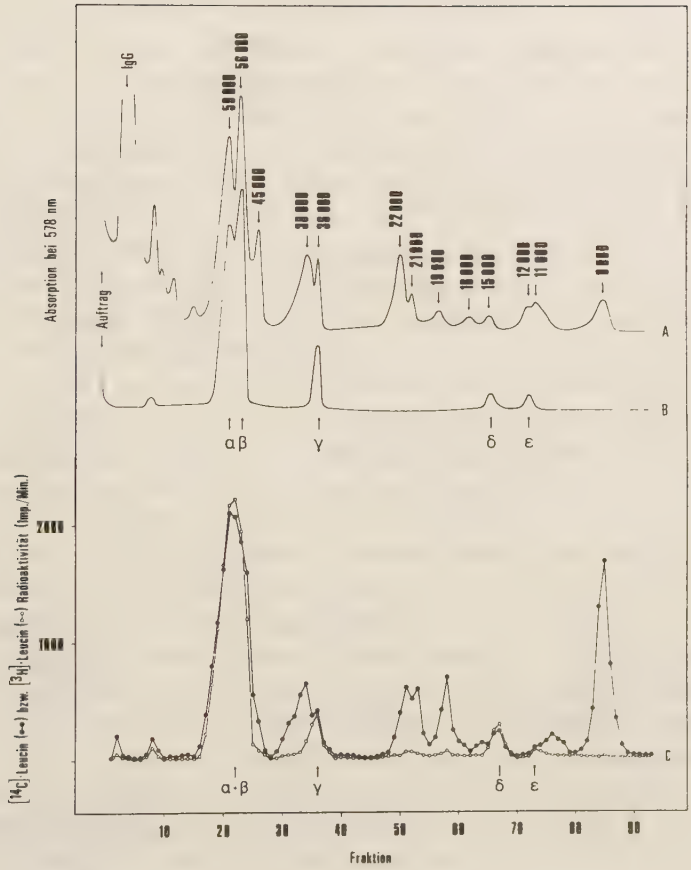

ABB. 9. Untereinheiten—Zusammensetzung von immunpräzipitiertem ATPase Komplex und löslicher ATPase (F_1). Alle Polypeptide wurden in 12.5%igen Polyacrylamid—gelen durch Elektrophorese in Gegenwart von $NaDodSO_4$ getrennt. (A) 20 µg ATPase Komplex und (B) 10 µg F_1 ATPase wurden separat in ihre Komponenten aufgetrennt, und von diesen nach Färbung mit Coomassie Blau ein Pherogramm bei 578 nm aufgenommen. (C) 7 µg eines [^{14}C]Leucin—markierten ATPase Komplexes (6 000 cpm/µg) und 40 µg einer [^{3}H]Leucin—markierten F_1 ATPase (600 cpm/µg) wurden gemischt, im $NaDodSO_4$—gel aufgetrennt und die Radioaktivität nach dem im experimentellen Teil beschriebenen Verfahren eluiert. Die radioaktive Markierung der Proteine wurde nach [114] vorgenommen.

3.2 ISOLIERUNG DER UNTEREINHEITEN DER F_1 ATPase

VORBEMERKUNG. Durch das mit hoher Ausbeute und guter Reproduzierbarkeit arbeitende Verfahren zur Isolierung der F_1 ATPase war die Grundlage für die Anreicherung ihrer individuellen Untereinheiten geschaffen. Unabhängig von den in der Literatur für ein breites Spektrum von Organismen beschriebenen Methoden haben wir versucht, die lösliche mitochondriale ATPase aus Neurospora crassa mit Hilfe von $NaDodSO_4$ in ihre Proteinkomponenten zu dissoziieren, und diese in der Gegenwart desselben Detergens säulen—chromatographisch rein darzustellen. Das in Abbildung 10 wiedergegebene Schema zeigt, daß zur Reinigung der Untereinheiten zwei methodisch verschiedene Wege eingeschlagen wurden.

Die beiden großen Untereinheiten (α,β) konnten durch Gradienten—Elution des disaggregierten Enzymproteins über Hydroxyapatit (Calciumphosphat) gewonnen werden. Diese von TISELIUS et al. [131] erstmals beschriebene, auch in Gegenwart von $NaDodSO_4$ [132] arbeitende Adsorptionschromatographie trennt Proteinkomponenten nicht (nur) in Abhängigkeit von ihren Molekulargewichten, sondern durch Ausnutzung wenig bekannter Wechselwirkungen zwischen Gel, Protein und Detergens, so daß sie auch die Isolierung von Polypeptiden mit ähnlichen Mobilitäten im $NaDodSO_4$—gel erlaubt.

Die kleinen Untereinheiten (γ,δ,ε) konnten entsprechend ihren Wanderungsverhalten im $NaDodSO_4$—gel mit Hilfe der Filtration von dissoziierter ATPase in SEPHADEX G 100 (γ, δ+ε) bzw. Trennung von (δ+ε) in BIOGEL P 30 erhalten werden.

Für die Anreicherung von α, β und γ war ein durch Gradienten—Elution über DEAE—Cellulose nachgereinigtes Enzym einzusetzen, da das in Abbildung 6 (S. 19) mit a bezeichnete Polypeptid von den in Hydroxyapatit und SEPHADEX G 100 zu isolierenden Untereinheiten nicht mehr abgetrennt werden konnte. Im Falle von δ und ε wurde auf die Re—chromatographie von F_1 verzichtet, weil sie (in der Regel) wenig Inhibitor enthielt (ein günstiger Umstand, wenn man bedenkt, daß mit der weiteren Reinigung des Enzyms 50% Protein verloren wurden, (δ+ε)

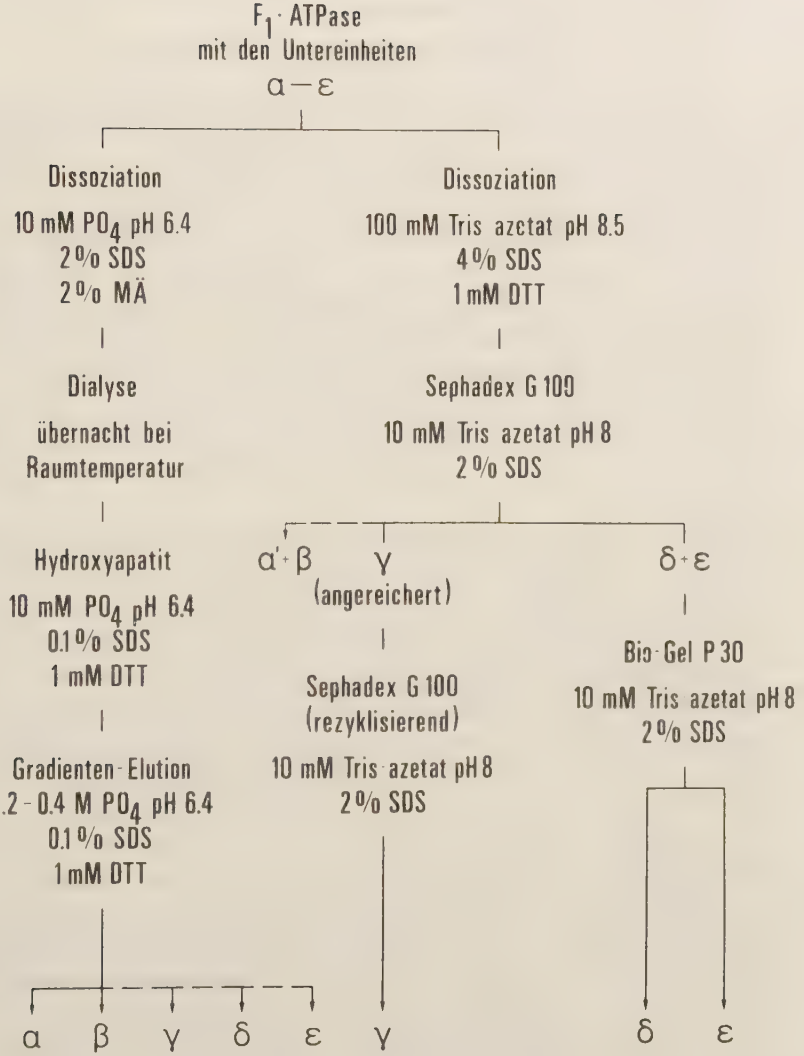

ABB. 10. Übersicht über die Arbeitsgänge zur Isolierung der Untereinheiten-Polypeptide der F_1 ATPase aus Neurospora crassa.

nur 5% der löslichen ATPase umfassen, und ihre Trennung ebenfalls mit Einbußen verbunden war).

3.2.1 TRENNUNG DER GROSSEN UNTEREINHEITEN

Für die Trennung der α und β Untereinheit in Hydroxyapatit wurde native F_1 ATPase bei einem Massenverhältnis $NaDodSO_4$:Protein von 5:1 unter der reduzierenden Wirkung von Mercaptoäthanol dissoziiert und dann zur Entfernung von überschüssigem Detergens für 12 Stunden bei Raumtemperatur gegen einen 0.1% $NaDodSO_4$ enthaltenden Phosphatpuffer dialysiert. Während der Dialyse wurde offenbar jene kritische Detergens–Konzentration, mit der die Reaggregation der Untereinheiten einsetzt, nicht unterschritten, da sich kein Niederschlag absetzte. Wurde die dialysierte Proteinlösung mit Hilfe der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophorese geprüft, so imponierten die 5 Untereinheiten in unveränderten molaren Relationen.

Durch weitere Verdünnung der dialysierten Lösung mit Puffer bis zu einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml wurde eine maximale Bindung des denaturierten Proteins an das Gel erreicht, und die $NaDodSO_4$–Konzentration an die Elutionsbedingungen adaptiert. Die optimale Anreicherung von α und β resultierte aus der Elution von dissoziierter ATPase mit einem von 0.2–0.4 M linear ansteigenden Phosphat–Gradienten, der in ein Volumen von 800 ml Puffer aufgenommen war. Das Elutionsprofil dieser bei 25 °C und pH 6.4 in Gegenwart von 0.1% $NaDodSO_4$ und 1 mM Dithiothreitol durchgeführten Chromatographie ist in Abbildung 11 zusammen mit der Verteilung der Untereinheiten unter dem Gradienten dargestellt. Die Asymmetrie des Profils, und der elektrophoretische Befund verdeutlichen, daß die Untereinheiten unter den gewählten Bedingungen nicht vollständig getrennt, sondern vielmehr in Form einander partiell überlagernder Fraktionen eluiert wurden, und zwar mit steigender Phosphat–Konzentration in der Reihenfolge: δ+ε (nicht dargestellt), γ, α und β.

Wurden die Fraktionen in geeigneter Weise "geschnitten",

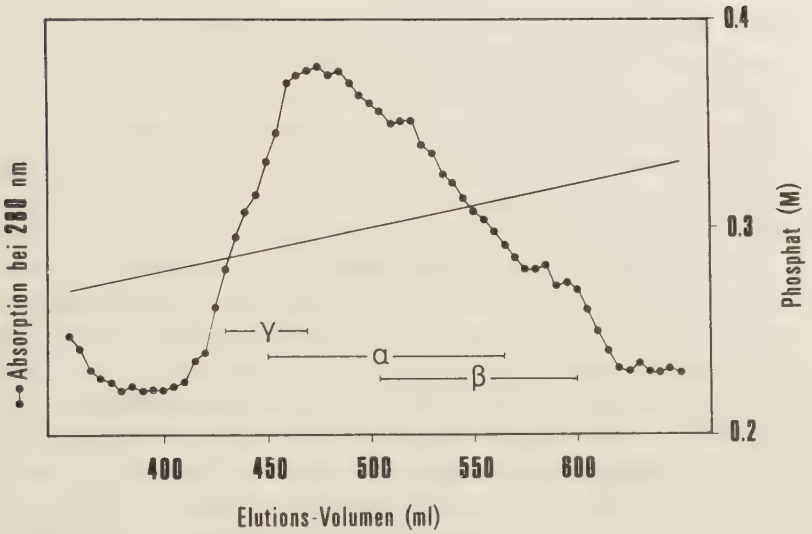

ABB. 11. Anreicherung der Untereinheiten α und β durch Gradienten-Elution von dissoziierter F_1 ATPase über Hydroxyapatit. 20 mg Enzymprotein wurden nach Dissoziation in $NaDodSO_4$ auf die Säule (Abmessungen: 12 X 1.6 cm; Gelhöhe: 10 cm) gegeben und mit 800 ml eines von 0.2–0.4 M linear ansteigenden Phosphat-Gradienten bei einer Flußrate von 20 ml/Stunde eluiert. Die Verteilung der Untereinheiten unter dem Gradienten wurde mit Hilfe der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid-gel Elektrophorese ermittelt: Von jeder Fraktion wurden 20 µl entnommen, und das darin enthaltene Protein in einem 12.5%igen Gel getrennt. Nach Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Blau wurde das Muster jeder Fraktion mit dem bei 280 nm aufgenommenen Elutionsprofil korreliert.

so konnten mit Hilfe dieser Chromatographie aus 20 mg Enzymprotein 2.5 mg α und 1 mg β Untereinheit in homogener Form gewonnen werden. Die im Vergleich zu α geringe Ausbeute an β Untereinheit wurde durch das unterschiedliche Adsorptions- bzw. Elutionsverhalten beider und dem daraus resultierenden Ausmaß ihrer gegenseitigen Oberlappung bedingt. Wurde das in den einzelnen Fraktionen enthaltene Protein im $NaDodSO_4$-gel aufgetrennt und nach Färbung mit Coomassie Blau der mengenmäßige Anteil jeder Untereinheit an Hand ihrer Farbintensi-

tät kalkuliert, so ließ sich zweierlei zeigen: (1) Die Hauptmasse der α Untereinheit wurde konzentriert in einem scharfen Gipfel bei 0.3 M Phosphat eluiert. Dieses Protein war im $NaDodSO_4$–gel rein, die Fraktionen jenseits davon durch γ bzw. β überlagert. (2) Im Falle der β Untereinheit mußte der Gradient einen Bereich von 0.3–0.33 M Phosphat überstreichen, ehe alles Protein aus dem Gel eluiert war. Etwa 60% der mit β angereicherten Fraktionen wurden von abnehmenden Mengen α Untereinheit kontaminiert. Zieht man beide Befunde zusammen, so ist ersichtlich, daß β in annähernd gleicher Menge wie α aus der Säule erhalten wurde, infolge weitgehender Verunreinigung durch α aber nur ein Drittel des gesammelten Eluates brauchbar war. In gleicher Weise mußte ein Großteil der mit α Untereinheit angereicherten Fraktionen verworfen werden, die Hauptmasse des Proteins erschien jedoch rein in einem kleinen Volumen (das ungleiche chromatographische Verhalten der beiden großen Untereinheiten findet sein Korrelat in dem annähernd symmetrischen Gipfel (α) bzw. dem stetig abfallenden Schenkel (β) des Elutionsprofils).

Das eben skizzierte Verfahren ist das Ergebnis einer Reihe von Experimenten, die mit dem Ziel durchgeführt wurden, optimale Bedingungen für die Trennung der α und β Untereinheit in Hydroxyapatit zu schaffen. Dabei hat sich gezeigt, daß das Trennvermögen einer definierten Menge Gel im wesentlichen durch pH, Temperatur, Proteinbeladung und Steigung des Gradienten bestimmt wird. So führte beispielsweise die Steigerung der Temperatur (bei sonst unveränderten Versuchsbedingungen) von 25 auf 30 °C zu 2 Proteinfraktionen, die Gemische von α+γ und α+β enthielten. Die Erhöhung der Proteinbeladung von regulär 20 auf 40 mg verbesserte die Ausbeute deutlich, reduzierte aber die Trennung von α und β insofern, als sich ihre Elutionsmolaritäten einander annäherten. Erschwert wurde die systematische Auswertung der experimentellen Befunde, und damit auch die Herausarbeitung gut reproduzierbarer und optimaler Trennbedingungen durch die Veränderung des chromatographischen Verhaltens aller Untereinheiten

mit der Variation eines Parameters sowie durch die Heterogenität des selbstgefertigten Hydroxyapatit–gels.

3.2.2 ISOLIERUNG DER KLEINEN UNTEREINHEITEN

(1) TRENNUNG VON γ UND δ+ε. Die kleinen F_1–Untereinheiten wurden unter Ausnutzung der Unterschiede ihrer Molekulargewichte mit Hilfe der Ausschluß–Chromatographie isoliert. In einem ersten Arbeitsgang wurde natives Enzymprotein in Gegenwart von 4% $NaDodSO_4$ und 1 mM Dithiothreitol bei pH 8.5 und Raumtemperatur dissoziiert und dann durch Filtration in SEPHADEX G 100 in zwei Polypeptidfraktionen: β+γ und δ+ε aufgespalten. Die dabei aufgetretenen praktischen Schwierigkeiten waren im wesentlichen durch folgende Umstände bedingt: (a) Die Polypeptid–Untereinheiten des dissoziierten Enzyms mußten während der Permeation im Gel durch $NaDodSO_4$ in Lösung gehalten werden. Da die Anwesenheit von Detergens die Viskosität des Puffers erhöhte, und diese wiederum die Trennkapazität des Gels verminderte, mußte für $NaDodSO_4$ eine Konzentration gewählt werden, die sowohl die Löslichkeit der Polypeptide als auch ihre Separation ermöglichte. (b) Im Hinblick auf die nur 5% des Enzymproteins umfassende (δ+ε)–Fraktion und die mit ihrer Trennung zu erwartenden Verluste, sollte es möglich sein, größere Mengen (d. h. 300–400 mg) F_1 ATPase mit einem Säulenlauf zu fraktionieren. Für die Angleichung der Viskosität von Proteinlösung und Elutionspuffer wurde ein Lösungsmittelvolumen erforderlich, zu dem sich das Fassungsvermögen der Säule wie etwa 100:1 verhalten mußte.

Durch Beschränkung der $NaDodSO_4$–Konzentration im Elutionspuffer auf 2% und Reduktion der Proteinkonzentration der aufzutragenden Probe auf 10 mg/ml war es möglich, 300–400 mg F_1 ATPase in einer 3 Liter fassenden Säule von SEPHADEX G 100 zu filtrieren. Das in Abbildung 12 dargestellte Elutionsprofil zeigt 2 basis–getrennte Proteinfraktionen, die Gemische von β+γ bzw. δ+ε enthielten. Etwa 30% der γ Untereinheit wurden in Form einer Schulter rein, δ und ε hingegen nur unwe-

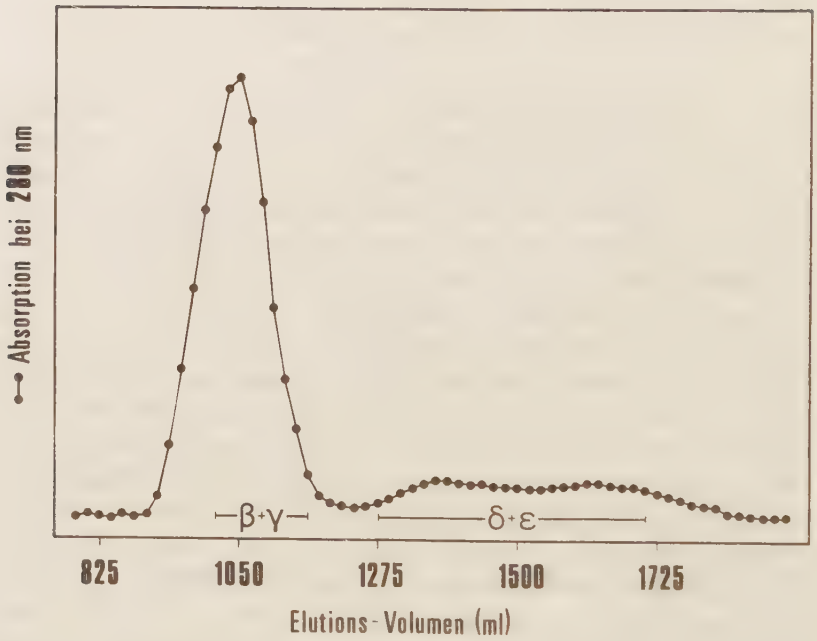

ABB. 12. Aufspaltung von 300 mg dissoziierter F_1 ATPase in Gemische von β+γ und δ+ε durch Filtration in einer Säule von SEPHADEX G 100 (Abmessungen: 100 X 5.5 cm; Flußrate: 30 ml/Stunde) in Gegenwart von 2% $NaDodSO_4$ bei pH 8 und Raumtemperatur. Das Elutionsprofil wurde mit Hilfe eines Durchfluß-photometers bei 280 nm aufgenommen. Die Verteilung der Polypeptide wurde durch Analyse der einzelnen Fraktionen im $NaDodSO_4$-gel ermittelt.

sentlich getrennt erhalten. Die Ausbeute des eluierten Untereinheitenproteins entsprach (mit Ausnahme von α) seinem prozentualen Anteil am Enzym.

Nach Chromatographie von dissoziierter ATPase in SEPHADEX G 100 unter den geschilderten Bedingungen wurde die α Untereinheit regelmäßig vermißt. Andererseits erschienen im $NaDodSO_4$-gel Polypeptidbanden (P_1: ∼ 53 000; P_2: ∼ 48 000 Dalton), die das Enzym vor der Filtration nicht enthalten hatte (vgl. hierzu Abb. 13). Als mögliche Ursachen für den Ver-

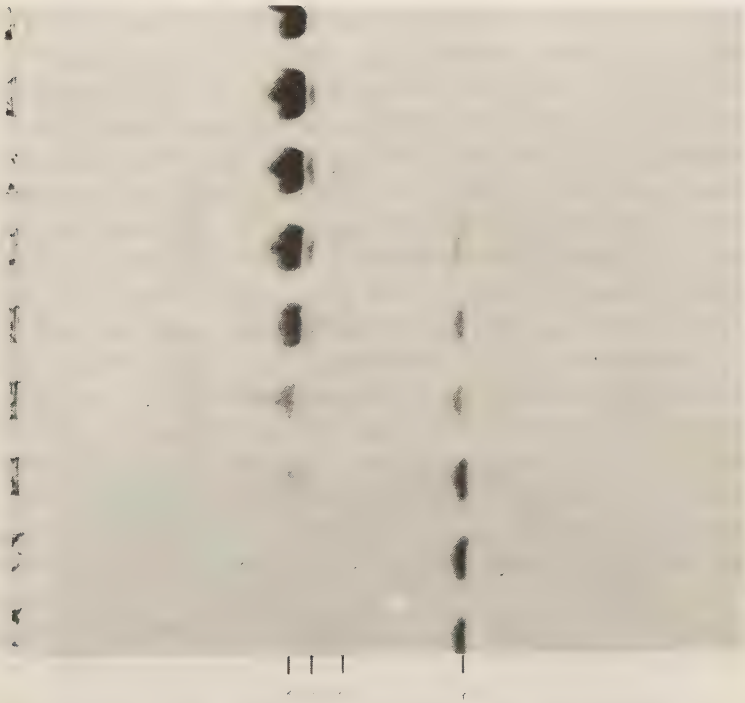

ABB. 13. Polypeptid-Zusammensetzung der (β+γ)-Fraktion nach Filtration von dissoziierter ATPase in SEPHADEX G 100. Von jeder Fraktion wurden 20 µl entnommen, und das darin enthaltene Protein in einem 12.5%igen Polyacrylamid-gel in Gegenwart von $NaDodSO_4$ aufgetrennt. Neben den Untereinheiten β und γ erkennt man 2 Polypeptidbanden mit scheinbaren Molekulargewichten von etwa 53 000 Dalton (P_1) und 48 000 Dalton (P_2).

lust von α während der Permeation in SEPHADEX G 100 können wenigstens zwei Umstände in Betracht gezogen werden: (a) Retardierung der Untereinheit durch Wechselwirkung mit dem Gel (quervernetztes Dextran) oder (b) Abbau durch Proteasen, die während der Reinigung des Enzyms nicht entfernt bzw. als sekundäre Kontamination durch Mikroorganismen in das Gel entlassen wurden.

Die verzögerte (und auch beschleunigte) Elution von Proteinen während der Filtration in einem Molekularsieb wird häufig gefunden. Beides kann durch Wechselwirkungen erklärt werden, die von den Carboxylgruppen im Gel einerseits und von den aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) im Protein andererseits ausgehen können [133]. Eine durch die Wirkung der Carboxylgruppen beispielsweise bedingte Retardierung der α Untereinheit ist unwahrscheinlich, da in Gegenwart von 2% $NaDodSO_4$ und bei einem pH von 8.0 das Protein negativ geladen, und somit eine Interaktion mit ebenfalls negativ geladenen Carboxylgruppen kaum möglich ist.

Die Annahme eines proteolytischen Abbaus von α hingegen erscheint realistisch, wenn man bedenkt, daß das Lösen des Enzyms (durch Behandlung der Mitochondrien mit Chloroform) mit der Eröffnung von cytosolischen Vesikeln verbunden sein kann, die Proteasen enthalten (vgl. hierzu S. 18). Die in Abbildung 13 erkennbaren Polypeptidbanden P_1 und P_2 würden folgerichtig Abbauprodukte der α Untereinheit repräsentieren.

Um die Vermutung einer proteolytischen Modifikation der α Untereinheit zu bestätigen wurde folgendes Experiment durchgeführt: 1 mg F_1 ATPase (mit dem Reinheitsgrad nach Gradienten-Elution über DEAE-Cellulose) wurde in 200 µl Puffer gelöst, und das darin enthaltene Protein durch Zugabe von Trichloressigsäure in einer Endkonzentration von 10% praezipitiert. Der Niederschlag wurde in 40 µl eines 0.1 M Tris-Puffers (pH 8.5) aufgenommen, in Gegenwart von 4% $NaDodSO_4$ und 2% Mercaptoäthanol dissoziiert und dann in einer Säule von SEPHADEX G 100 unter unveränderten Bedingungen (10 mM Tris-acetat pH 8.0; 2% $NaDodSO_4$; Raumtemperatur) filtriert. Das bei 280 nm kontinuierlich registrierte Elutionsprofil ließ 3 definierte Abschnitte erkennen (vgl. hierzu Abb. 14): Einen streng symmetrischen, den Hauptteil des eluierten Proteins enthaltenden Gipfel (a,b), eine sich daran anschließende flache Schulter (c,d) und schließlich, knapp vor dem hinteren Ausschluß der Säule, einen nur wenig Protein enthaltenden 2.

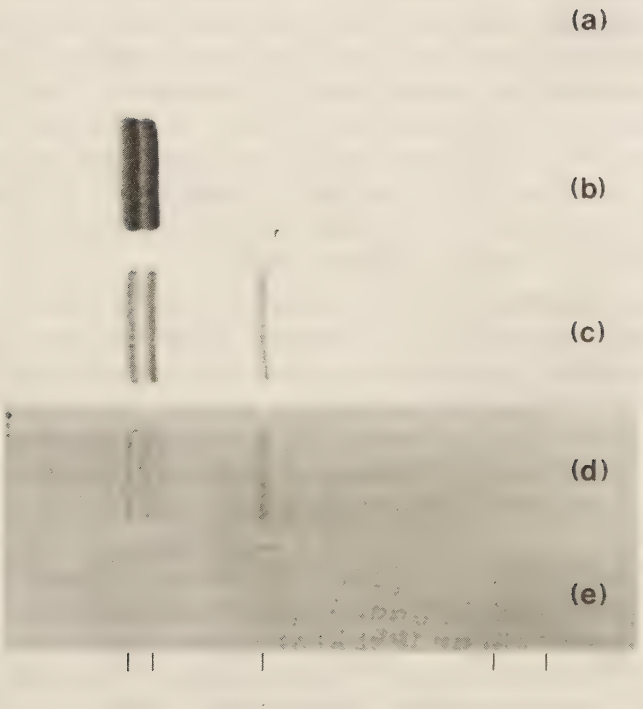

ABB. 14. Polypeptid—Zusammensetzung der F_1 ATPase (1 mg) nach Präzipitation mit Trichloressigsäure, Dissoziation in Gegenwart von $NaDodSO_4$/Mercaptoäthanol und Filtration in SEPHADEX G 100 (150 X 0.7 cm). Aus 5 Fraktionen des Eluates wurden je 20 µl entnommen, das darin enthaltene Protein in einem 12.5%-igen $NaDodSO_4$/Polyacrylamid—gel aufgetrennt, und die resultierenden Bandenmuster (a—e) mit Coomassie Blau gefärbt. α—ε bezeichnen die Untereinheiten der reinen ATPase.

Gipfel (e). Aus jeder Region wurden Proben entnommen, und die Polypeptid—Zusammensetzung mit Hilfe der Elektrophorese untersucht. Das Ergebnis der Analyse von 5 Fraktionen (a—e) ist in der Abbildung 14 dargestellt: Demnach kann eine strukturell intakte α Untereinheit eluiert werden, wenn das Enzymprotein

vor seiner Dissoziation und Filtration in SEPHADEX G 100 mit Trichloressigsäure ausgefällt wird. Unterstellt man, daß die im $NaDodSO_4$–gel reine F_1 ATPase dennoch proteolytisch aktive Beimengungen enthalten kann, so läßt sich die Wirkung der Trichloressigsäure mit der irreversiblen Denaturierung von Enzymprotein und co–isolierter(n) Protease(n) erklären (RYRIE et al. [134] weisen darauf hin, daß es äußerst unwahrscheinlich ist, die Protease(n) im $NaDodSO_4$–gel zu entdecken: Reicht doch im Falle von Subtilisin/Albumin ein Massenverhältnis von $1:10^6$ aus, um das Substrat in Gegenwart von 1% $NaDodSO_4$ vollkommen abzubauen [135]).

(2) ISOLIERUNG DER γ UNTEREINHEIT. Durch Filtration von dissoziierter ATPase in SEPHADEX G 100 wurden zwei Fraktionen angereichert, die Gemische von β+γ und δ+ε enthielten. Da bereits ein Säulenlauf ausreichte, um etwa 30% der eluierten γ Untereinheit in Form einer Schulter rein zu gewinnen, lag es nahe, durch rezyklisierende Chromatographie in SEPHADEX G 100 β und γ vollständig von einander zu trennen.

Die mit β+γ angereicherten Fraktionen wurden zunächst mit Hilfe der Druckdialyse soweit wie möglich eingeengt und dann in Gegenwart von 0.05% $NaDodSO_4$ in einer Säule von BIOGEL P 10 filtriert (dieser zusätzliche Arbeitsschritt war notwendig, um das während der Volumen–Konzentrierung stark angereicherte Detergens wieder aus dem Proteingemisch zu entfernen).

Das Ergebnis der Rezyklisierung von β+γ in SEPHADEX G 100 ist in Abbildung 15 dargestellt. Entsprechend der geringeren Proteinbeladung wurden Säulenvolumen und Flußrate reduziert, die für die 3–Liter–Säule gewählten Bedingungen (10 mM Tris–acetat pH 8.0; 2% $NaDodSO_4$; Raumtemperatur) jedoch unverändert beibehalten. Mit dem zweiten Säulendurchgang wurden 2 deutlich getrennte Proteinfraktionen eluiert, die eine elektrophoretisch reine γ bzw. eine, durch proteolytische Abbauprodukte (α) kontaminierte β Untereinheit, enthielten. Die Verluste durch Volumen–Konzentrierung und Filtration in BIOGEL P 10 eingerechnet, betrug die Ausbeute an reiner γ Untereinheit etwa 30% der mit dem Enzym einst eingesetzten Menge.

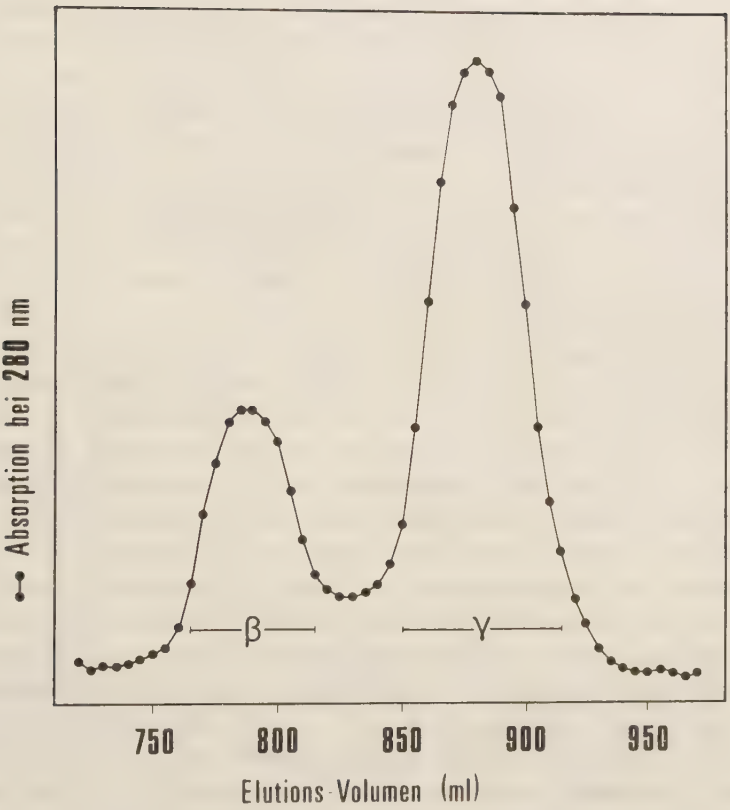

ABB. 15. Rezyklisierende Chromatographie eines Gemisches von β+γ in SEPHADEX G 100. Die Säule (100 X 4 cm) wurde mit 17.5 mg Protein beladen und in Gegenwart von 2% $NaDodSO_4$ bei pH 8 und Raumtemperatur mit einer Flußrate von 20 ml/Stunde eluiert. Der Auslauf wurde bei 280 nm kontinuierlich gemessen. Die Polypeptid—Verteilung nach dem zweiten Elutionszyklus wurde durch Analyse der einzelnen Fraktionen im $NaDodSO_4$—gel ermittelt.

(3) TRENNUNG VON δ+ε. Die für die Isolierung der γ Untereinheit beschriebene rezyklisierende Chromatographie in SEPHADEX G 100 konnte für den Zweck der Trennung von δ+ε nicht genutzt werden, obwohl mit einem Elutionszyklus eine, wenn

auch nur unvollständige Separation beider Polypeptide erreicht wurde. Die unzureichende Auftrennung von δ+ε kann einmal damit zusammenhängen, daß die Molekulargewichte von δ und ε mit 15 000 bzw. 12 000 Dalton im Bereich des von der Literatur [133] für detergens–freie Puffer mit etwa 4 000 Dalton angegebenen hinteren Ausschlusses von SEPHADEX G 100 liegen. Darüber hinaus kann durch die Gegenwart von $NaDodSO_4$ sowohl das Elutionsverhalten der Untereinheiten als auch der Fraktionierbereich des Gels zu Ungunsten ihrer Trennung verändert worden sein.

Nachdem der Versuch, das Gemisch durch Gradienten–Elution über Hydroxyapatit zu separieren, erfolglos war, wurde in BIOGEL P 30 (–400 mesh) schließlich ein Molekularsieb gefunden, dessen Fraktionierbereich eine ausreichende Trennung von δ+ε in $NaDodSO_4$ gestattete. Das in SEPHADEX G 100 angereicherte Gemisch (vgl. Abb. 12) wurde zunächst unter den für die γ Untereinheit beschriebenen Bedingungen auf ein kleines Volumen eingeengt, in BIOGEL P 10 entsalzt und dann nach Zugabe von Dithiothreitol in einer Endkonzentration von 1 mM in BIOGEL P 30 chromatographiert. Das Elutionsprofil einer in Gegenwart von 2% $NaDodSO_4$ bei pH 8.0 und Raumtemperatur durchgeführten Filtration ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Prüfung des Eluates im $NaDodSO_4$–gel demonstrierte – in Obereinstimmung mit dem Proteinprofil – reine, im Abstand von nur einer Fraktion getrennte Polypeptide.

Dieses Ergebnis ist insofern nicht repräsentativ, als die in Abbildung 16 gezeigte Separation von δ+ε nicht mit jeder beliebigen Charge BIOGEL der Reihe P 30 (–400 mesh) reproduziert werden konnte. Ein zusätzlich limitierender Faktor war darin gegeben, daß die erfolgreiche Trennung der Untereinheiten an eine Säule mit den Dimensionen von 150 X 1 cm, eine Flußrate von maximal 2 ml/Stunde, eine Proteinbeladung von höchstens 5–6 mg in einem Endvolumen von 1 ml und eine einmalige Verwendung des Gels gebunden war.

Berücksichtigt man die Sammlung von δ+ε in SEPHADEX G 100, die Volumen–Einengung dieser Fraktion durch Druckdialyse und

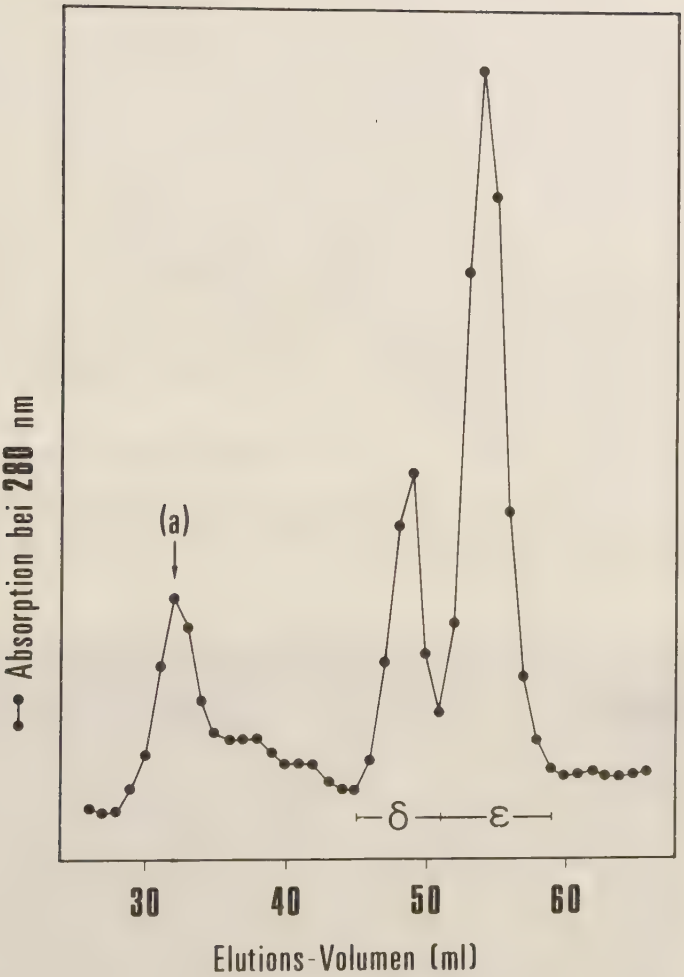

ABB. 16. Trennung von δ+ε in BIOGEL P 30 (—400 mesh). Die Säule (150 X 1 cm) wurde mit 6 mg Protein beladen und in Gegenwart von 2% $NaDodSO_4$ bei pH 8.0 und Raumtemperatur mit einer Flußrate von 2 ml/Stunde eluiert. Das Elutionsprofil wurde durch Meßung der einzelnen Fraktionen bei 280 nm aufgenommen. Die Polypeptid—Verteilung wurde durch Analyse der einzelnen Fraktionen im $NaDodSO_4$—gel ermittelt. (a): Eventuell aus aggregierten Untereinheiten bestehendes Material.

ihre Entsalzung in BIOGEL P 10, so resultiert für die Anreicherung von δ und ε folgende Bilanz: Nach Filtration von 370 mg dissoziierter F_1 ATPase in SEPHADEX G 100 (3–Liter–Säule) wurde die (δ+ε)–Fraktion gemäß ihrem Anteil von 5% (∼ 20 mg) im Enzymprotein erhalten. 50% (∼ 10 mg) davon wurden während der Volumeneinengung und/oder Entsalzung verloren. Nach Auftrennung von δ+ε in BIOGEL P 30 (zwei Filtrationen zu je 5 mg) betrug die Ausbeute an reiner Untereinheit 4.3 (δ) bzw. 3 (ε) mg, entsprechend 40% bzw. 30% der mit dem Enzym einst eingesetzten Menge (der scheinbare Widerspruch zwischen den als LOWRY–Protein bestimmten Ausbeuten von δ und ε und ihren korrespondierenden Flächen unter dem Elutionsprofil ist im spektrographisch nachgewiesenen Tryptophan–Gehalt der ε Untereinheit begründet).

3.2.3 REINHEIT DER ISOLIERTEN UNTEREINHEITEN

Die Reinheit der isolierten F_1 Untereinheiten wurde mit Hilfe der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophorese geprüft (vgl. hierzu Abb. 17).

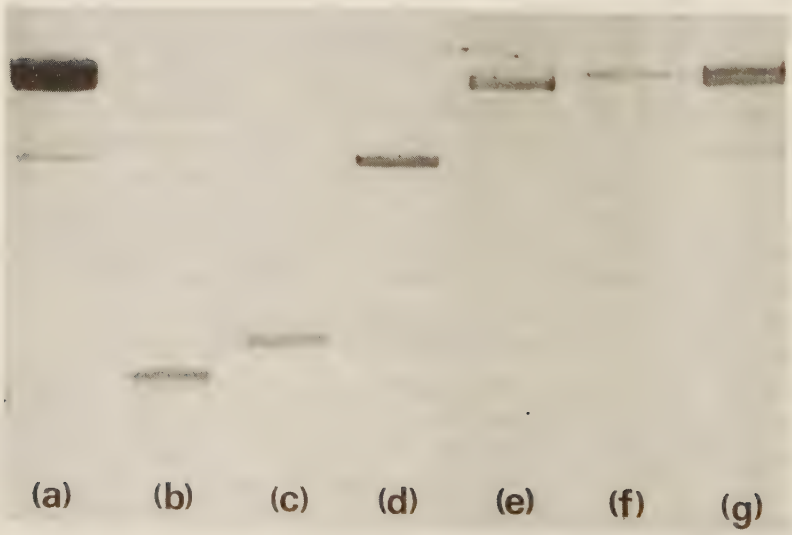

ABB. 17. Prüfung des Reinheitsgrades der isolierten Untereinheiten der löslichen ATPase aus Neurospora crassa mittels $NaDodSO_4$/Polyacrylamid—gel Elektrophorese. In einem 12.5%-igen Polyacrylamid—gel wurden folgende Proben aufgetragen: (a) 20 µg F_1 ATPase, (b) 5 µg ε, (c) 4 µg δ, (d) 4 µg γ, (e) 4 µg β, (f) 4 µg α und (g) 10 µg F_1 ATPase. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie Blau angefärbt.

3.3 CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN F_1 UNTEREINHEITEN

(1) AMINOSÄURE–ZUSAMMENSETZUNG. In der Tabelle II ist das Ergebnis der Aminosäure–Analyse der F_1 ATPase und ihrer Untereinheiten zusammengestellt. Obwohl unter einander auf den ersten Blick ähnlich, ist die Aminosäure–Zusammensetzung jeder Untereinheit individuell. δ beispielsweise zeichnet sich durch sehr niedrige Gehalte an Threonin, Asparaginsäure und Arginin aus, während dem gegenüber ihre Werte für Glutaminsäure und Valin mit 19 bzw. 12 Molprozent sehr hoch sind, so daß diese beiden Aminosäuren zusammen knapp ein Drittel des Proteins umfassen. Auffällig bei der ε Untereinheit ist einerseits die Alaninfraktion mit 20 Molprozent und andererseits das Fehlen von Methionin und Histidin. Wie bereits erwähnt, konnte für sie spektrographisch Tryptophan nachgewiesen werden.

Sieht man von geringfügigen Unterschieden bei Isoleucin, Leucin, Cystein und Threonin ab, so gleichen sich α und β im Verhältnis zu den anderen Untereinheiten am stärksten. Eine weitgehende Identität der Aminosäure–Gehalte in den beiden großen Untereinheiten wurde auch für die homologen Polypeptide der ATPase aus Rinderherz [136] und Hefe [50] sowie des korrespondierenden Enzyms aus Spinat–Chloroplasten [60,137] beschrieben.

Allen fünf Untereinheiten gemeinsam ist die überdurchschnittliche Repräsentation von Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glycin, Alanin und Valin sowie der niedrige Gehalt an Cystein.

Setzt man den prozentualen Anteil der polaren Aminosäuren (Asx, Thr, Ser, Glx, Lys, His und Arg) ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Aminosäure–Reste, so ergeben sich nach VANDERKOOI und CAPALDI [138] Polaritäten von 43.2 (F_1), 44.0 (α), 43.7 (β), 49.4 (γ), 43.5 (δ) und 49.2 (ε). Enzym wie Untereinheiten gehören demnach zu den "löslichen" Proteinen, wenn man für diese durchschnittliche Polaritäten von 47±6 zu Grunde legt [138].

TABELLE II

AMINOSÄURE—ZUSAMMENSETZUNG VON F_1 UND F_1 UNTEREINHEITEN IN MOLPROZENT

Cystein und Methionin wurden nach Oxidation mit Perameisensäure als Cysteinsäure und Methioninsulfon bestimmt. Die Anteile von Serin und Threonin wurden durch Extrapolation der Hydrolysezeit auf 0 Stunden ermittelt. Im Falle von Isoleucin und Valin wurden die Werte der 120 Stunden—Hydrolyse eingesetzt. Als Bezugsgrößen für die Normierung der bei verschiedenen Hydrolysezeiten erhaltenen Werte dienten Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Leucin und Phenylalanin. Alle in der Tabelle wiedergegebenen Werte wurden aus einer Analyse von F_1 ATPase bzw. F_1 Untereinheiten berechnet

	F_1	Untereinheiten der F_1 ATPase				
		Menge in der Komponente mit Molekulargewicht (X 10^{-3})				
Aminosäure		59 (α)	56 (β)	36 (γ)	15 (δ)	12 (ε)
		Mol/100 Mol				
Asparaginsäure	8.0	8.6	8.9	9.5	6.2	8.8
Threonin	5.5	5.3	7.0	7.2	0.7	4.2
Serin	5.1	5.3	5.0	7.7	9.7	10.4
Glutaminsäure	12.6	12.3	12.2	11.7	18.7	8.9
Prolin	4.2	3.9	4.7	1.5	3.8	2.4
Glycin	9.3	9.2	10.0	7.0	8.0	6.7
Alanin	10.7	10.0	9.8	12.0	12.1	20.0
Valin	8.8	9.3	8.4	6.8	12.1	6.3
Methionin	2.0	2.5	1.8	1.9	0.8	0.0
Isoleucin	6.3	5.0	7.0	7.8	6.2	3.4
Leucin	9.0	9.5	8.5	6.6	8.8	5.4
Tyrosin	2.4	2.3	2.1	2.7	2.0	2.8
Phenylalanin	3.6	3.4	3.7	3.1	2.4	2.8
Lysin	5.6	6.1	4.7	6.3	5.6	7.6
Histidin	1.2	1.1	1.3	1.0	1.7	0.4
Arginin	5.2	5.3	4.6	6.0	0.9	8.9
Cystein	0.6	0.9	0.3	1.1	0.3	0.3
Tryptophan	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Polarität	43.2	44.0	43.7	49.4	43.5	49.2

(2) N–TERMINALE AMINOSÄURE. Es wurde versucht, die N–terminale Aminosäure der F_1–Untereinheiten mit Hilfe der Dansyl–Methode [139] zu bestimmen. Eindeutige N–Termini konnten jedoch nur für δ (Alanin) und ε (Valin) gefunden werden. Die Untereinheiten der löslichen ATPase aus Rinderherz [47] und Chloroplasten [140] scheinen ebenfalls eine nicht zugängliche N–terminale Aminosäure zu besitzen.

3.4 BESTIMMUNG DER STÖCHIOMETRIE DER F_1 UNTEREINHEITEN

(1) VORBEMERKUNG. Trennt man die reine F_1 ATPase aus Neurospora crassa in Gegenwart von $NaDodSO_4$ in einem Polyacrylamid–gel in ihre Komponenten auf, so erscheinen nach Färbung mit Coomassie Blau fünf Polypeptidbanden, die mit den Untereinheiten des Enzyms korrelieren. Durch Vergleich mit den elektrophoretischen Mobilitäten von Referenz–Proteinen wurden die Molekulargewichte derselben mit 59 000 (α), 56 000 (β), 36 000 (γ), 15 000 (δ) und 12 000 (ε) Dalton ermittelt [126].

Nimmt man an, daß die Untereinheiten–Polypeptide im Enzym als Monomere vorliegen, so resultiert für dieses ein Molekulargewicht von $\sim$ 180 000 Dalton. Dieser Wert steht jedoch im Widerspruch zu dem, der für die mitochondriale F_1 ATPase mit durchschnittlich 360 000 Dalton bestimmt wurde [54]. Für die lösliche ATPase aus Neurospora crassa ist ein ähnliches Molekulargewicht anzunehmen, nachdem sie bei Filtration in ULTROGEL AcA 34 zwischen Ferritin (480 000 Dalton) und Katalase (240 000 Dalton) eluiert wurde.

Die Diskrepanz zwischen dem errechneten und dem experimentell (in Grenzen) ermittelten Molekulargewicht der F_1 ATPase löst sich auf mit der Vorstellung, daß im Enzym einige Untereinheiten mehrfach vorliegen. Die Antwort auf die Frage, wieviele Polypeptidketten einer Untereinheit im Holo–Enzym vertreten, d. h., wie die molaren Relationen der Untereinheiten beschaffen sind, hängt unmittelbar von der exakten Messung ihrer realen Proteinanteile in der löslichen ATPase ab.

(2) ERMITTLUNG DER MOLAREN RELATIONEN DER F_1 UNTEREINHEITEN AUS DER VERTEILUNG DES FARBSTOFFES COOMASSIE BLAU. Die reine F_1 ATPase wurde zunächst mit Hilfe der Elektrophorese in ihre Komponenten aufgetrennt, und diese durch Färbung mit Coomassie Blau sichtbar gemacht. Wurde das Bandenmuster densitometriert, und die Fläche unter jedem Gipfel (z. B. durch Ausschneiden und Abwiegen) ermittelt, so erhielt man ein Maß für die pro Untereinheit gebundene Farbstoffmenge. Aus zehn

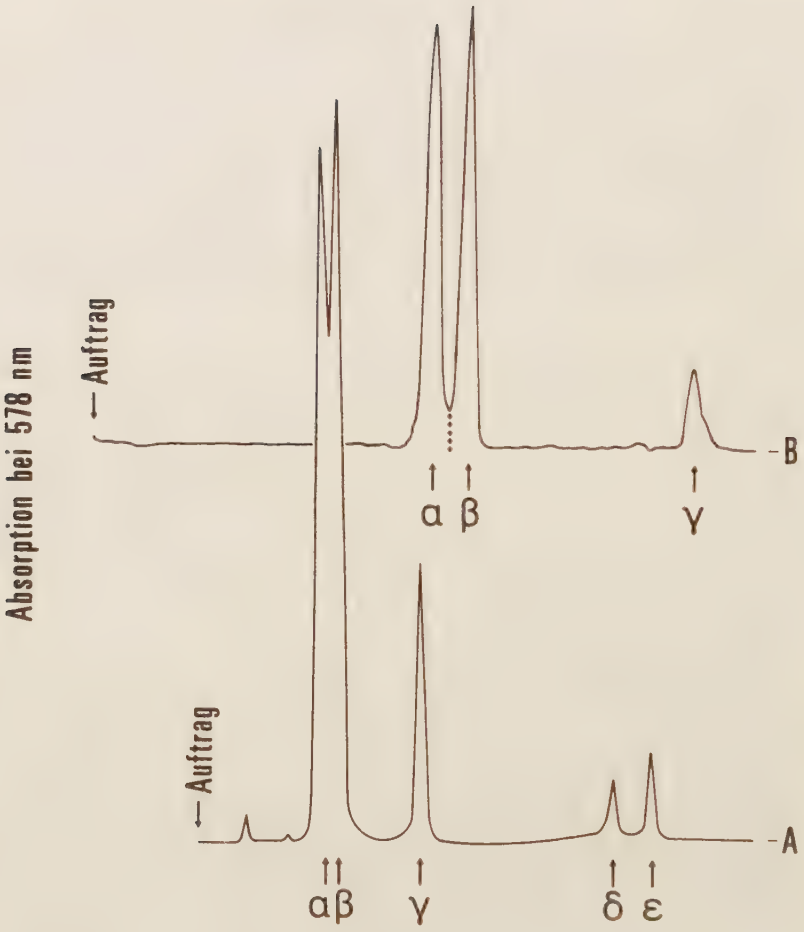

ABB. 18. Verteilung des Farbstoffes Coomassie Blau auf die Untereinheiten der reinen F_1 ATPase im $NaDodSO_4$–gel. (A) 20 µg Enzymprotein wurden in einem 12.5%igen Polyacrylamid–gel aufgetrennt, und die mit Coomassie Blau angefärbten Banden bei 578 nm densitometriert. (B) 10 µg Enzymprotein wurden in einem 12.5%igen Polyacrylamid–gel für 15 Stunden bei 30 mA/Gel getrennt, und die mit Coomassie Blau angefärbten Banden ebenfalls bei 578 nm densitometriert. α–ε benennen die Untereinheiten der reinen, löslichen ATPase.

verschiedenen F_1 Präparationen wurde mit Hilfe dieses Verfahrens eine durchschnittliche Farbstoffverteilung von 84.5% ($\alpha+\beta$), 9.6% (γ), 2.9% (δ) und 3.1% (ε) kalkuliert (vgl. Abb. 18 und Tab. III).

Setzt man der Einfachheit halber einmal voraus, daß die Menge des gebundenen Farbstoffes mit der Masse des Proteins korreliert, dann verteilt sich das gesamte F_1 Protein entsprechend den genannten Prozentzahlen auf die einzelnen Un-

TABELLE III

ERMITTLUNG DER MOLAREN RELATIONEN DER F_1 UNTEREINHEITEN AUS DER VERTEILUNG DES FARBSTOFFES COOMASSIE BLAU

Die reine F_1 ATPase aus zehn verschiedenen Enzym-Präparationen wurde in einem 12.5%igen Polyacrylamid-gel in Gegenwart von $NaDodSO_4$ in ihre Komponenten aufgetrennt, und diese mit Coomassie Blau gefärbt. Nach Densitometrierung der Bandenmuster wurde die Fläche unter jedem Gipfel durch Ausschneiden und Abwiegen ermittelt und als % Coomassie Blau in die Berechnung der Stöchiometrie eingesetzt

Untereinheit	Coomassie-Blau Farbe %	Molekulargewicht ($\times 10^{-3}$)	Molare Relationen
$\alpha+\beta$	84.5	115	≡ 3
γ	9.6	36	1.1
δ	2.9	15	0.8
ε	3.1	12	1

tereinheiten. Nach Division der relativen Proteinmassen der Untereinheiten (= % Coomassie Blau Farbe) mit ihren apparenten Molekulargewichten (X 10^{-3}) ergeben sich molare Relationen von: 0.736 (α+β), 0.264 (γ), 0.187 (δ) und 0.25 (ε). Setzen wir 0.736 ≡ 3, so resultiert eine Stöchiometrie von 3 (α+β), 1.1 (γ), 0.8 (δ) und 1.0 (ε). Rechengrößen und Ergebnis sind in Tabelle III noch einmal zusammengefaßt.

Bei einer Wanderungsstrecke von 7 cm Cytochrom c in der $NaDodSO_4$/Polyacrylamid-gel Elektrophorese wurden die beiden großen Untereinheiten nur unvollständig getrennt, so daß der von α und β allein gebundene Farbstoff nicht ermittelt werden konnte. Erst nach Fortführung der Elektrophorese für etwa 15 Stunden ($\sim$ 18 cm Cytochrom c) war die Separation ausreichend (vgl. hierzu Pherogramm B in Abb. 18). Aus dem Densitogramm wurde das Verhältnis der Farbanteile von α:β mit 1:1 bestimmt. Wird diese Relation mit den in Tabelle III aufgeführten Größen kombiniert, so läßt sich die Stöchiometrie der Untereinheiten der löslichen ATPase aus Neurospora crassa mit der Formel $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ angeben.

Dieses Ergebnis ist insofern inkorrekt, als gleiche Massen Untereinheiten-Protein unterschiedliche Mengen Farbstoff binden, und somit das Untereinheiten-Protein nicht mehr der prozentualen Verteilung von Coomassie Blau entspricht. Wurde von jeder Untereinheit eine definierte, nach LOWRY et al. [123] gemessene Menge Protein (4 µg) im $NaDodSO_4$-gel angefärbt, und die Fläche des korrespondierenden Pherogramms auf 1 mg Untereinheiten-Protein umgerechnet, so resultierten Färbefaktoren (Planimeter-Einheit/mg Protein) von: 1.2 (α), 1.5 (β), ≡ 1.0 (γ), 0.9 (δ) und 1.5 (ε). Nach Korrektur der Prozentzahlen für die Verteilung von Coomassie Blau auf die Untereinheiten verhalten sich die relativen Proteinmassen von α:β:γ:δ:ε wie 34.5:28.2:9.6:3.2:2.1. Werden diese Werte mit den entsprechenden Molekulargewichten (X 10^{-3}) dividiert und wird der Betrag für γ ≡ 1 gesetzt, so erscheinen die Untereinheiten in den molaren Relationen: 2.2 (α), 1.9 (β), ≡ 1.0 (γ), 0.8 (δ) und 0.7 (ε).

Die Frage, welche der beiden Formeln – $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$, $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\varepsilon$ – der Stöchiometrie der F_1 Untereinheiten aus Neurospora crassa gerecht wird, kann mit dieser Methode nicht sicher entschieden werden. Die Formel $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\varepsilon$ scheint jedoch zuverlässiger zu sein als $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$, da sie die spezifischen Färbefaktoren der Untereinheiten beinhaltet. Um sie zu erhärten, haben wir versucht, die molaren Relationen der F_1 Untereinheiten auf einem anderen, unabhängigen Weg zu berechnen.

(3) ERMITTLUNG DER MOLAREN RELATIONEN DER F_1 UNTEREINHEITEN AUS DER VERTEILUNG EINER [^{3}H]LEUCIN–MARKIERUNG. In Analogie zur Färbung mit Coomassie Blau kann das Untereinheiten–Protein aus der Verteilung der [^{3}H]Leucin–Markierung einer im NaDodSO$_4$–gel aufgetrennten F_1 ATPase ermittelt werden, wenn die Leucin–Gehalte des Enzyms und seiner Untereinheiten bekannt sind [141].

Durch Aminosäure–Analyse wurden die Leucin–Anteile (Molprozent) von F_1 und F_1 Untereinheiten mit: 9.0 (F_1), 9.5 (α), 8.5 (β), 6.6 (γ), 8.8 (δ) und 5.4 (ε) bestimmt. Multipliziert man die in Tabelle II aufgeführten Molprozentzahlen mit den entsprechenden Molekulargewichten der Aminosäuren (abzüglich des Molekulargewichtes von Wasser), und bildet weiterhin aus den errechneten Werten die Summe, so ergeben sich Molekulargewichte von 10 785 (F_1), 10 804 (α), 10 701 (β), 10 840 (γ), 10 524 (δ) und 10 543 (ε) Dalton pro 100 Mol Aminosäuren. Daraus errechnen sich Gehalte von 0.83 (F_1), 0.88 (α), 0.79 (β), 0.61 (γ), 0.84 (δ) und 0.51 (ε) µMol Leucin pro mg Protein.

Die Verteilung des in der F_1 ATPase enthaltenen Leucins auf ihre Untereinheiten konnte erfaßt werden, wenn der exponentiell wachsenden Hyphen–Kultur für eine Verdoppelungszeit (3 Stunden) [^{3}H]Leucin zugesetzt, daraus das Enzymprotein gewonnen und dann im NaDodSO$_4$–gel aufgetrennt wurde. Ein typisches Verteilungsmuster einer [^{3}H]Leucin–markierten F_1 ATPase nach Trennung im NaDodSO$_4$–gel ist in Abbildung 19 dargestellt. Auf der Grundlage von drei verschiedenen [^{3}H]Leucin–markierten Enzympräparationen konnte mit Hilfe von insge-

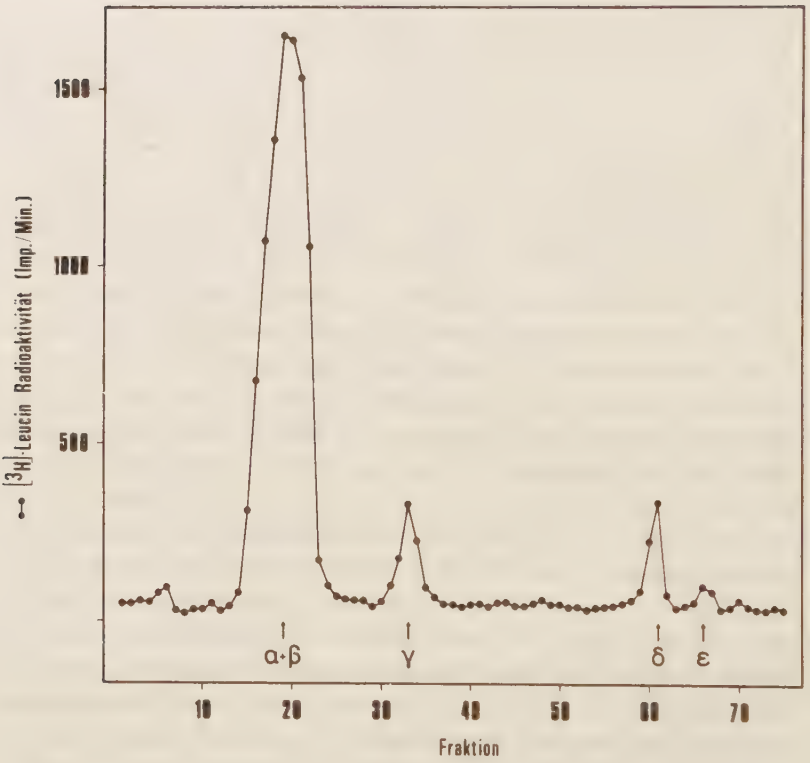

ABB. 19. Verteilung der [^{3}H]Leucin–Markierung von F_1 ATPase im $NaDodSO_4$–gel. 40 µg Protein mit einer spezifischen Radioaktivität von 750 cpm/mg wurden in Gegenwart von $NaDodSO_4$ in einem 12.5%igen Polyacrylamid–gel getrennt, und nach Fraktionierung des Gels die Radioaktivität entsprechend dem im experimentellen Teil beschriebenen Verfahren bestimmt.

samt neun Elektrophoresen eine durchschnittliche [^{3}H]Leucin–Verteilung (in Prozent) von 84.3 (α+β), 8.0 (γ), 5.4 (δ) und 2.2 (ε) ermittelt werden.

Unter der Voraussetzung, daß jede Untereinheit gemäß ihrem Leucin–Anteil markiert wurde, kann nun berechnet werden, daß sich das Leucin von 1 mg F_1 (0.83 µMol) auf die einzelnen Untereinheiten mit 0.699 (α+β), 0.066 (γ), 0.045 (δ) und

0.018 (ε) µMol verteilt. Da der Leucin-Gehalt pro mg Untereinheiten-Protein aus der Aminosäure-Analyse bekannt ist, lassen sich die wahren Proteinanteile der Untereinheiten pro mg Enzymprotein bestimmen, indem die Werte, die die Verteilung des Leucins von 1 mg F_1 ATPase auf die Untereinheiten repräsentieren, mit den Leucin-Gehalten (µMol/mg) der Untereinheiten dividiert werden: Ein mg lösliche ATPase enthält somit 0.838 (α+β), 0.109 (γ), 0.053 (δ) und 0.036 (ε) mg Protein. Nach Division dieser Proteinmassen mit den entsprechenden Molekulargewichten der Untereinheiten resultieren molare Relationen von 7.3:3.0:3.5:3.0 für α+β:γ:δ:ε bzw. 2.1:0.9:1.0:0.8, wenn der Betrag für δ als interner Standard gewählt wird. Rechengang und Ergebnis sind in der Tabelle IV noch einmal zusammengestellt.

TABELLE IV

ERMITTLUNG DER MOLAREN RELATIONEN DER F_1 UNTEREINHEITEN AUS DER VERTEILUNG EINER [^{3}H]LEUCIN-MARKIERUNG

Neun Proben aus drei verschiedenen Präparationen einer [^{3}H]-Leucin-markierten F_1 ATPase wurden in Gegenwart von $NaDodSO_4$ in 12.5%igen Polyacrylamid-gelen aufgetrennt. Die Verteilung der [^{3}H]Leucin-Radioaktivität auf die F_1 Untereinheiten wurde durch Fraktionierung der Gele ermittelt, und die Prozentzahlen in die Berechnung der molaren Relationen eingesetzt

Untereinheit	[^{3}H]-Leucin %	Protein % $= \dfrac{\%\,[^3H]\text{-Leucin} \times \dfrac{\mu\text{Mol Leucin}}{\text{mg } F_1\text{-Protein}}}{\dfrac{\mu\text{Mol Leucin}}{\text{mg Untereinheiten-Protein}}}$	Molekulargewicht (X 10^{-3})	Molare Relationen
α·β	84.3	83.8	115	2.1
γ	8.8	10.9	38	0.9
δ	5.4	5.3	15	= 1
ε	2.2	3.6	12	0.8

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 ZÜCHTUNG DER NEUROSPORA CRASSA–HYPHEN

(1) ARBEITSGANG. Hyphen von Neurospora crassa (Wildtyp 74 A) wurden in VOGELs [109] Minimalmedium (2% Saccharose) bei einer Temperatur von 25 °C unter steriler Belüftung gezüchtet. Mit 2 X 10^6 Konidien/ml wurde das Kulturmedium inokuliert. Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase (d. h. nach etwa 15–18 Stunden) wurden die Hyphen geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei –18 °C aufbewahrt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug in der Regel 8–10 g Hyphen pro Liter Kulturmedium (sog. Hyphen–Feuchtgewicht).

(2) HOMOGENE MARKIERUNG DES GESAMTEN ZELLPROTEINS [114]. Um das gesamte Zellprotein radioaktiv zu markieren, wurde einer wachsenden Kultur 15 Stunden nach der Inokulation [^{3}H]-Leucin (2–10 mCi/Liter) zugegeben, nach weiteren 3 Stunden die Hyphen daraus geerntet, und dann die spezifische Radioaktivität (etwa 3 X 10^5–1.5 X 10^6 cpm/mg Protein) bestimmt.

4.2 PRÄPARATION SUBZELLULÄRER FRAKTIONEN

(1) MITOCHONDRIEN [110,111]. Tiefgefrorene Hyphen (etwa 3 kg) wurden zunächst manuell zerkleinert, Portionen zu je 170 g in einem 6–fachen Volumen Isolationsmedium I (0.25 M Sucrose, 1 mM EDTA) aufgeschwemmt (Endvolumen 1 Liter) und dann bei Kälte (4 °C) in Gegenwart von 0.5 mM PMSF mit einem Küchenmixer 1 Minute lang homogenisiert. Durch Zugabe von 1–2 ml 2 M Tris–base wurde der pH des Homogenates zwischen 7.5 und 7.8 gehalten. Die Zellen des Homogenates wurden dann mit einer von WEISS et al. [111] beschriebenen Mühle aufgebrochen, wobei darauf zu achten war, daß der Zellaufschluß ohne größere Schaumbildung gesammelt, ausreichend mit Eiswürfeln gekühlt und sein pH um 7.5 gehalten wurde. Nach Zentrifugation des Zellaufschlusses bei ~ 1 000 rpm für 3 Minuten (STOCK Zentrifuge) wurden die Mitochondrien im Oberstand erhalten und dann bei 8 000 rpm für 60 Minuten in einem SORVALL–GS 3–Rotor sedimentiert. Die honig–farbene Masse wurde

gewonnen, in Isolationsmedium II (0.25 M Sucrose, 10 mM Tris–acetat pH 7.5, 1 mM EDTA) resuspendiert, homogenisiert (Potter nach ELVEJHEM) und erneut niedrig zentrifugiert (2 000 rpm für 15 Minuten im SORVALL–GS 3–Rotor bei 4 °C). Der erhaltene Oberstand wurde nach Zugabe von PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM und pH–Korrektur auf 7.5 mit 2 M Tris–base im selben Rotor bei 8 000 rpm für 60 Minuten zentrifugiert, und die daraus resultierenden Pellets in wenig Isolationsmedium II aufgenommen. Nach Zugabe von ATP (Endkonzentration 2 mM) und erneuter Einstellung des pH auf 7.5 mit 2 M Tris–base wurde die gereinigte Mitochondrien–Fraktion bis zur weiteren Aufarbeitung bei –18 °C aufbewahrt.

(2) SUBMITOCHONDRIALE MEMBRAN–PARTIKEL (SMP). Tiefgefrorene Mitochondrien wurden nach dem Auftauen bis 0 °C mit dem Isolationsmedium II so verdünnt, daß die Proteinkonzentration 20 mg/ml betrug. Nach Einstellen des pH auf 7.5 mit 2 M Tris–base und Zugabe von PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Suspension in Form von 100 ml–Portionen in einem Eisbad für 1 Minute ultrabeschallt (BRANSON Sonifier, Modell S 75, Stufe 8) und im Anschluß daran in einer kalten BECKMAN Zentrifuge (Modell Spinco, Rotortyp Ti 30) 120 Minuten bei 30 000 rpm zentrifugiert. Die Sedimente wurden gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung unter den für Mitochondrien beschriebenen Bedingungen aufbewahrt.

4.3 LÖSEN DER F_1 ATPase

(1) BEHANDLUNG SUBMITOCHONDRIALER MEMBRAN–PARTIKEL MIT ULTRASCHALL. Submitochondriale Membran–Partikel wurden mit dem Isolationsmedium II zu einer Suspension von 10 mg/ml verdünnt; nach Zugabe von ATP (Endkonzentration 2 mM) und Alkalisierung bis pH 8.5 mit 2 M Tris–base wurde die Suspension in Form von 100 ml–Portionen in einem geeigneten Becherglas 10 Minuten lang ultrabeschallt (BRANSON Sonifier, Modell S 75, Stufe 8), wobei die Temperatur während des Beschallens durch Eiswasserkühlung zwischen 25–30 °C gehalten wurde (anderenfalls die Prozedur solange abgebrochen werden mußte,

bis sich die Temperatur wieder innerhalb der genannten Grenzen befand). Anschließend wurde die beschallte Suspension mit 1 N Essigsäure bis pH 5.4 titriert, und der dabei entstandene Niederschlag durch Zentrifugation bei 20 000 rpm für 10 Minuten (SORVALL Zentrifuge, Rotortyp SS 34, 25 °C) entfernt. Die gelb-farbenen Oberstände wurden gewonnen und mit 2 M Tris-base auf pH 7.5 eingestellt.

AMMONIUMSULFAT-PRAEZIPITATION. Durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (0.5 g/ml: entsprechend einer Sättigung von 70%) wurde das in den Oberständen enthaltene Protein präzipitiert und in dieser Form bis zur weiteren Reinigung bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt.

SEPHADEX G 50-CHROMATOGRAPHIE. Durch Zentrifugation bei 20 000 rpm für 15 Minuten (SORVALL Zentrifuge, Rotortyp SS 34, 4 °C) wurde das präzipitierte Protein sedimentiert, in wenig TEA-Puffer (: 10 mM Tris-acetat pH 7.5, 1 mM EDTA und 2 mM ATP) aufgenommen und dann in einer mit demselben Puffer äquilibrierten Säule von SEPHADEX G 50 ("coarse") chromatographiert. Die Säule (50 X 2.5 cm, Gelhöhe: 30 cm) wurde bei einem hydrostatischen Druck von 20 cm Wassersäule (entsprechend einer Flußrate von 100 ml/Stunde) eluiert; gesammelt wurde die im vorderen Ausschluß des Gels wandernde gelbe Proteinfraktion. Die Arbeitstemperatur entsprach der des Raumes.

(2) BEHANDLUNG MITOCHONDRIALER MEMBRANEN MIT CHLOROFORM. Tiefgefrorene submitochondriale Membran-Partikel bzw. ganze Mitochondrien wurden nach dem Auftauen bis 0 °C in Medium II zu einer Suspension von 10 mg Protein pro ml verdünnt und dann bei Kälte homogenisiert (Potter nach ELVEJHEM); nachdem der pH auf 7.5 eingestellt, wurde ATP in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugegeben. Alle nun folgenden Arbeitsgänge wurden bei Raumtemperatur ausgeführt.

Aliquots der Suspension von 20 ml wurden in chloroformbeständige Zentrifugenbecher (passend zum Rotor SS 34 der SORVALL Zentrifuge) vorgelegt und mit gleichen Volumina Chloroform solange mäßig geschüttelt (in der Regel 1-3 Minuten), bis sich eine homogene Emulsion bildete. Diese wurde für 10

Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert, und daraus die gelb-farbenen Oberstände gewonnen. Durch Sedimentation für 10 Minuten bei 20 000 rpm wurden die vereinigten wäßrigen Phasen von unlöslichen Rückständen und verbliebenem Chloroform befreit; ihr pH wurde anschließend mit 2 M Tris-base auf 7.5 eingestellt.

4.4 REINIGUNG DER F_1 ATPase

(1) CHROMATOGRAPHIE IN DEAE-CELLULOSE. Bezogen auf 500-600 mg Protein wurden 20 g DEAE-Cellulose (DE 52 WHATMAN) in 100 ml TEA-Puffer aufgeschwemmt und in einer Glassäule mit Einweghahn (Abmessungen: 50 X 2.5 cm, Gelhöhe: ca. 5 cm) solange mit TEA-Puffer ins Gleichgewicht gesetzt, bis der pH des Eluates 7.5 betrug.

Das durch Ultraschall- bzw. Chloroformbehandlung der Membranen in Lösung gebrachte Protein wurde nach Verdünnung mit TEA-Puffer an das Gel adsorbiert (sichtbar als gelb-braune Bande) und mit 300 ml TEA-Puffer sowie 300 ml einer 30 mM KCl-Lösung (in TEA) gewaschen, wobei braun-farbenes Material und Chloroform ausgeschwemmt wurde. Die an der Geloberfläche verbliebene, schwach gelb-farbene Proteinbande wurde mit einer 300 mM KCl-Lösung (in TEA) in einem Volumen von etwa 50 ml eluiert.

Nach Zugabe von festem Ammoniumsulfat (0.5 g/ml) wurde das praezipitierte Protein 10 Minuten lang bei 20 000 rpm in einer SORVALL Zentrifuge (Rotortyp SS 34, 4 ^{o}C) sedimentiert und die daraus resultierenden Pellets in einem kleinen Volumen (etwa 10 ml) TEA-Puffer aufgenommen. Denaturiertes Protein und eventuelle Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation bei 20 000 rpm für 5 Minuten entfernt. Dieser und alle weiteren Arbeitsgänge wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

(2) FILTRATION IN BIOGEL A-0.5m. Die hoch-konzentrierte Proteinlösung (40-50 mg/ml) wurde in einer mit TEA äquilibrierten Säule (Abmessungen: 150 X 3 cm) von BIOGEL A-0.5m (100-200 mesh) bei einem hydrostatischen Druck von 30 cm Was-

sersäule (~ 30 ml/Stunde) filtriert. Der Auslauf wurde kontinuierlich mit einem bei 280 nm arbeitenden Durchflußphotometer registriert. Unmittelbar nach dem vorderen Ausschlußvolumen (von etwa 500 ml) wurde die enzymatisch aktive Proteinfraktion in einem Volumen von 60–90 ml erhalten. Das Protein wurde nach Ammoniumsulfat–Präzipitation bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

(3) GRADIENTEN–ELUTION ÜBER DEAE–CELLULOSE. Das durch Ammoniumsulfat präzipitierte Protein wurde nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 20 000 rpm (SORVALL Zentrifuge, Rotortyp SS 34) in TEA–Puffer gelöst und dann zur Entfernung des verbliebenen Ammoniumsulfats 1–2 Stunden lang bei Raumtemperatur gegen TEA–Puffer dialysiert. Durch Zugabe von TEA–Puffer wurde die Lösung auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt und dann auf eine Säule von DEAE–Cellulose (Abmessungen: 12 X 1.6 cm, Gelhöhe: 10 cm) aufgetragen. Die Säule wurde bei einer Flußrate von 20 ml/Stunde mit 600 ml eines von 0–300 mM KCl (in TEA) linear ansteigenden Gradienten eluiert; die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden in einem Volumen von etwa 50 ml erhalten. Nach Aussalzen mit Ammoniumsulfat wurde das reine Enzym bei 4 °C aufbewahrt.

4.5 TRENNUNG DER GROSSEN UNTEREINHEITEN

(1) DISSOZIATION DES ENZYMS. Eine 20 mg F_1 Protein enthaltende Ammoniumsulfat–Fällung wurde 10 Minuten lang bei 20 000 rpm sedimentiert (SORVALL Zentrifuge, Rotortyp SS 34) und das resultierende Pellet in 4.4 ml eines 10 mM Phosphat–Puffers (pH 6.4) aufgenommen. Durch Zugabe von 0.5 ml einer 20%igen $NaDodSO_4$–Lösung sowie 0.1 ml Mercaptoäthanol in der genannten Reihenfolge wurde das Enzymprotein dissoziiert. Unlösliches Material und Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 20 000 rpm (SORVALL Zentrifuge, Rotortyp SS 34) entfernt. Die Proteinlösung wurde dann 12 Stunden lang bei Raumtemperatur gegen 2 Liter Puffer (10 mM Phosphat pH 6.4, 0.1% $NaDodSO_4$, 1 mM DTT) dialysiert und im Anschluß daran mit Puffer auf eine Proteinkonzentration von

1 mg/ml verdünnt.

(2) CHROMATOGRAPHIE IN HYDROXYAPATIT. Eine Säule von Hydroxyapatit (Abmessungen: 12 X 1.6 cm, Gelhöhe: 10 cm) wurde bei einer Temperatur von 25 ^{o}C und einer Flußrate von 20 ml/Stunde mit dem oben genannten Phosphat–Puffer ins Gleichgewicht gebracht und dann mit der dialysierten und verdünnten Proteinlösung beladen. Nachdem die Säule mit 20 ml Puffer gewaschen worden war, wurde sie mit 800 ml eines linearen Gradienten von 0.2–0.4 M Phosphat (in 0.1% $NaDodSO_4$, 1 mM DTT; pH 6.4) bei unveränderter Flußrate und Temperatur entwickelt. Das Proteinprofil wurde durch Messung der einzelnen Fraktionen bei 280 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (CARY II) aufgenommen. Durch $NaDodSO_4$/Polyacrylamid–gel Elektrophorese wurden die mit α und β Protein angereicherten Fraktionen ermittelt und nach Vereinigung mit Hilfe der Druckdialyse konzentriert. Das selbstgefertigte Hydroxyapatit–gel wurde zur Proteintrennung nur einmal verwendet.

(3) VOLUMEN–EINENGUNG DURCH DRUCK–DIALYSE. Zur Einengung des Proteins wurden Ultrafiltrations–Membranen (AMICON, Typ PM 10) mit 25 bzw. 76 mm Durchmesser verwendet. Der Kammer–Druck wurde auf 4–5 atm eingestellt.

4.6 ISOLIERUNG DER KLEINEN UNTEREINHEITEN

(1) DISSOZIATION DES ENZYMS. 100 mg einer mit Ammoniumsulfat gefällten F_1 ATPase wurden für 10 Minuten bei 20 000 rpm (SORVALL Zentrifuge, Rotortyp SS 34) zentrifugiert, und das resultierende Pellet in 7.9 ml TEA–Puffer gelöst. Unter Rühren wurden dann bei Raumtemperatur 2 ml einer 20%igen $NaDodSO_4$–Lösung, 1 ml eines 1 M Trisacetat–Puffers (pH 8.5) sowie 0.1 ml einer 0.1 M DTT–Lösung hinzugegeben. Verunreinigungen und eventuell unlösliches Material wurden durch Zentrifugation bei 20 000 rpm für 5 Minuten (SORVALL Zentrifuge, Rotortyp SS 34) entfernt.

(2) FILTRATION IN SEPHADEX G 100. Die Proteinlösung wurde in einer vorher mit 10 mM Tris–acetat pH 8.0/2% $NaDodSO_4$ ins

Gleichgewicht gebrachten Säule (100 X 5.5 cm) von SEPHADEX G 100 bei Raumtemperatur filtriert. Die Durchflußrate betrug ~ 30 ml/Stunde. Mit Hilfe eines Durchflußphotometers (LKB, Modell UVICORD II) wurde der Auslauf kontinuierlich bei 280 nm registriert. Die γ bzw. δ+ε Protein enthaltenden Fraktionen wurden im $NaDodSO_4$–gel identifiziert und nach Vereinigung in der Dialysekammer konzentriert.

(3) FILTRATION IN BIOGEL P 10. Zur Verdünnung des bei der Druck–Dialyse angereicherten $NaDodSO_4$ wurde die Proteinlösung in einer Säule (50 X 3 cm) von BIOGEL P 10 bei Raumtemperatur chromatographiert. Der Elutionspuffer enthielt 0.05% $NaDodSO_4$. Der hydrostatische Druck wurde mit 50 cm Wassersäule gewählt. Im vorderen Ausschluß der Säule wurde das Protein erhalten.

(4) FILTRATION IN SEPHADEX G 100. Nach Zugabe von DTT in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die angereicherte γ Untereinheit (gelöst in einem Volumen von 2 ml) in einer Säule von SEPHADEX G 100 (100 X 4 cm) bei Raumtemperatur und einer Flußrate von 20 ml/Stunde in Gegenwart von 10 mM Tris–acetat pH 8.0/2% $NaDodSO_4$ rezyklisierend chromatographiert. Nach dem zweiten Durchgang wurde das Protein in einem Volumen von etwa 60 ml erhalten.

(5) FILTRATION IN BIOGEL P 30. Eine Säule von BIOGEL P 30 (–400 mesh) wurde bei Raumtemperatur mit 10 mM Tris–acetat pH 8.0/2% $NaDodSO_4$ äquilibriert und dann mit der in SEPHADEX G 100 angereicherten (δ+ε)–Fraktion beladen. Etwa 6 mg Protein wurden mit einer 2%igen $NaDodSO_4$–Lösung auf ein Volumen von 1 ml verdünnt und DTT in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Bei einer Flußrate von exakt 2 ml/Stunde wurde die Säule (Abmessungen: 150 X 1 cm) eluiert, und Fraktionen von 1 ml gesammelt. Das Elutionsprofil wurde durch Messung der einzelnen Fraktionen bei 280 nm aufgenommen. Im $NaDodSO_4$–gel wurden die δ bzw. ε Protein enthaltenden Fraktionen identifiziert, und ihr Volumen durch Druck–Dialyse eingeengt.

4.7 ANALYTISCHE VERFAHREN

(1) PROTEIN–BESTIMMUNG. Das Protein wurde gemäß der von LOWRY et al. [123] beschriebenen Methode mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

(2) ATPase–TEST [142]. 0.5 ml ATPase–Mix (0.1 M Tris–acetat pH 8.5, 8 mM $MgSO_4$) sowie 0.4 ml Aqua bidest wurden in einen Netheler–Becher vorgelegt, und darin ein Aliquot Enyzmlösung bei 37 °C für 1 Minute inkubiert (die Menge des zugesetzten Enzyms wurde immer so gewählt, daß maximal etwa 25 nMol Substrat/Minute zur Hydrolyse kamen). Durch Zusetzen von 0.1 ml 0.5 M ATP wurde die enzymatische Reaktion gestartet und für 5 Minuten bei 37 °C belassen. Mit 0.2 ml einer 50%igen Trichloressigsäure–Lösung wurde die Reaktion beendet und das denaturierte Protein durch Zentrifugation bei 12 000 rpm für 2 Minuten (EPPENDORF Tischzentrifuge) entfernt. Vom Oberstand wurden 0.2 ml in ein neues EPPENDORF–Reaktionsgefäß pipettiert, eventuell verbliebenes Protein mit 0.4 ml einer 10%igen Trichloressigsäure–Lösung ausgefällt und dann durch Zugabe von 0.1 ml Ammoniummolybdat sowie 0.05 ml Methol–Reagens die Bildung des blau–violetten Farbstoffes Ammoniummolybdatophosphat gestartet. Nach exakt 10 Minuten wurde die Reaktion gestoppt, und die entstandene Farbe bei 578 nm mit einem Photometer EPPENDORF gemessen.

Aus einer Eichkurve (die Extinktion 1.0 entsprach 430 nMol Phosphat) wurde die im Testansatz enthaltene Menge Phosphat berechnet, und dann die Aktivität bzw. die spezifische Aktivität der ATPase mit Hydrolyse von µMol ATP/Minute/ml Enzymlösung bzw. mg Enzymprotein angegeben.

AMMONIUMHEPTAMOLYBDAT. 12.5 g Ammoniumheptamolybdat wurden in 100 ml heißen Wassers gelöst und nach dem Abkühlen mit 125 ml einer 10 N Schwefelsäure versetzt. Mit Aqua dest wurde die Lösung auf ein Endvolumen von 250 ml aufgefüllt.

METHOL–REAGENS. 25 g Natriumpyrosulfit und 0.4 g 4–Methylaminophenolsulfat wurden in 100 ml Wasser gelöst und in einer mit Aluminiumfolie umwickelten Flasche aufbewahrt.

(3) NADODSO$_4$/POLYACRYLAMID–GEL ELEKTROPHORESE. Für die Elektrophorese in Gegenwart von NaDodSO$_4$ wurden Polyacrylamid–gele verwendet, die Acrylamid, Bisacrylamid und Ammoniumperoxodisulfat in einem Massenverhältnis von 125:30:1 enthielten.

In der Regel wurden 12.5%ige Gele verwendet und aus folgendem Ansatz hergestellt: 62.5 g Acrylamid, 2.08 g Bisacrylamid und 0.5 g Ammoniumperoxodisulfat wurden mit Elektrophorese–Puffer (: 0.1 M Tris–acetat pH 8.0, 0.5% NaDodSO$_4$) auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt, und unmittelbar vor dem Gießen der Gele 1 µl/ml Lösung Tetramethyläthylendiamin unter Rühren hinzugefügt. Das Polymerisationsgemisch wurde dann in Kunststoffschablonen mit vorgeformten Auftragsspalten (10 X 1 X 2 mm) für 15–20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Gele für 12 Stunden in Elektrophorese–Puffer äquilibriert und bis zu ihrer Verwendung in demselben Puffer bei 4 ^{o}C aufbewahrt.

Die Proteinproben wurden in einem NaDodSO$_4$–Puffer (2% NaDodSO$_4$, 5% Mercaptoäthanol, 0.1 M Tris–acetat pH 8.0) aufgenommen, wenige Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und davon 20 µl (mit 20–40 µg Protein) aufgetragen. Nachdem das Protein bei 30 mA/Gel eingewandert war, wurden die Gele mit einem aus Plastik gefertigten Kühlblock bedeckt, und die Stromstärke auf 60 mA/Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde solange durchgeführt, bis das als Referenz aufgetragene Cytochrom c (vom Pferd) 7 cm gewandert war.

COOMASSIE BLAU–FÄRBUNG. Zur Färbung des Proteins wurden die Gele für mindestens 3 Stunden in eine Lösung von Coomassie Brillant Blau in Methanol/Wasser/Eisessig (5/5/1, v/v/v) gelegt, in dem reinen Lösungsmittel wieder entfärbt und in 10%iger Essigsäure–Lösung aufbewahrt.

PHEROMETRIE. Zur densitometrischen Auswertung der gefärbten Proteinbanden wurden Pherogramme von 15 mm Breite ausgeschnitten und (eingeklemmt zwischen zwei Glasplatten) auf einem Schlitten befestigt, der mit einem konstanten Vorschub von 20 mm/Minute den Lichtweg (begrenzt durch eine Punktblen-

de von 0.1 mm Durchmesser) eines Photometer EPPENDORF (Typ 1101 M7) passierte. Die bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessene Extinktion wurde von einem Schreiber mit einem Papiervorschub von 50 mm/Minute aufgezeichnet.

(4) MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT. Radioaktivität wurde mit einem Flüssigkeits–Szintillations–Spektrometer (PACKARD, Modell TRICARB 3320) gemessen. Die Proteinproben wurden in 0.5 ml $NaDodSO_4$–Puffer (1% $NaDodSO_4$, 0.1 M Tris–acetat pH 8.0) aufgenommen, in 15 ml einer 0.6%igen Lösung von PERMABLEND III in Toluol/Methylglykoll (3/2, v/v) szintilliert und sodann gemessen. Für ^3H betrug die Zählausbeute 24.5%.

Um die über ein Polyacrylamid–gel verteilte Radioaktivität zu erfassen, wurden von diesem 1 mm dicke Scheibchen gewonnen, und das darin enthaltene Protein mit $NaDodSO_4$–Puffer für 12 Stunden bei einer Temperatur von 50–60 ^oC eluiert.

(5) AMINOSÄURE–ANALYSE. 5–10 nMol Protein wurden mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) in einem EPPENDORF Reaktionsgefäß ausgefällt, und der Niederschlag mit 1 ml 10%iger Trichloressigsäure sowie 2 mal 1 ml Aceton gewaschen. Anschließend wurde der Niederschlag in 250 µl konzentrierter Ameisensäure aufgenommen. Von dieser Lösung ausgehend wurden Aliquots (mit 0.5–1 nMol Protein) in einseitig zugeschmolzene Glasröhrchen überführt und im Exsikkator über KOH eingetrocknet. Nach Zugabe von 200 µl 5.7 N Salzsäure wurden die Röhrchen nach mehrmaligem Einleiten von Stickstoff unter Ölpumpenvakuum zugeschmolzen. Die Proben wurden dann bei 105 ^oC 24, 48, 72 und 120 Stunden hydrolysiert.

PERAMEISENSÄURE–OXIDATION [143]. Zusätzlich wurde zur Bestimmung des Cystein– und Methioningehaltes eine Probe mit Perameisensäure oxidiert und für 24 Stunden ebenfalls bei 105 ^oC hydrolysiert. Ein Gemisch aus 0.5 ml 30%igem Wasserstoffperoxid und 9.5 ml konzentrierter Ameisensäure wurde für 2.5 Stunden bei Raumtemperatur belassen, und dann das zu oxidierende Protein (1–2 nMol) in 0.05 ml dieser Lösung aufgenommen. Die Reaktion wurde für 2 Stunden in einem Eisbad

fortgeführt. Nach dem Eintrocknen im Exsikkator wurden die Proben ebenfalls hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden eingetrocknet und mit einem DURRUM 500 bzw. mit einem im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München gebauten Gerät [144] analysiert.

(6) BESTIMMUNG DER N-TERMINALEN AMINOSÄURE MIT HILFE DER DANSYL-METHODE [139]. 1-2 nMol Protein wurden mit Trichloressigsäure ausgefällt, mit Aceton gewaschen und dann in Hydrolyseröhrchen überführt (vgl.: Vorbereitung der Proben zur Aminosäure-Analyse). Nach dem Eintrocknen im Exsikkator wurde der Rückstand mit 20 µl 0.2 M $NaHCO_3$ aufgenommen und wieder eingetrocknet. Zur Reaktion mit Dansylchlorid wurde eine frisch bereitete Lösung verwendet: 2.5 mg Dansylchlorid in 1 ml Aceton, 1/1 (v/v) mit Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 10 µl dieser Lösung zu den eingetrockneten Proben wurden diese solange (in der Regel 30 Minuten) bei 40-50 ^{o}C inkubiert, bis die gelbe Farbe verblaßt war. Die abermals eingetrockneten Proben wurden unter Vakuum in 50 µl 5.7 N Salzsäure für 8 Stunden bei 105 ^{o}C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde über KOH bis zur völligen Trockne eingeengt und dann in 5-10 µl 95%igem Äthanol gelöst.

Jeweils 1-2 µl dieser Proben wurden dann auf beidseitig beschichtete Polyamidplatten aufgetragen und nacheinander in folgenden Fließmitteln chromatographiert: I: 1.5%ige Ameisensäure, dann senkrecht dazu II: Benzol/Eisessig (10/1, v/v) und III: Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig (20/1/1, v/v/v). Zur Bestimmung der Dansylderivate von Arginin und Histidin wurde als Laufmittel IV: 3%iger Ammoniak verwendet (Laufrichtung wie bei I).

Die N-terminale Aminosäure wurde unter einer UV-Lampe bei 254 bzw. 350 nm an Hand eines auf der Rückseite der Polyamidplatten chromatographierten Standards identifiziert.

4.8 VERWENDETE MATERIALIEN

[^{3}H]Leucin (40–60 Ci/mMol in 0.01 N HCl), [^{14}C]Leucin (270 mCi/mMol): NEW ENGLAND NUCLEAR Corporation, Boston; U. S. A. ATP, Saccharose, Tris–HCl, EDTA, PMSF, Methol, Folin, Perhydrol, Ammoniumheptamolybdat, Natriumpyrosulfit, 4–Methylaminophenolsulfat, Ammoniumperoxodisulfat, Schwefelsäure, Essigsäure, Salzsäure, Essigsäureäthylester, Methanol, Äthanol, Benzol, Aceton, Ammoniak, Ammoniumsulfat, weitere Salze und Lösungsmittel: MERCK AG, Darmstadt. Cytochrom c (Pferd), Bisacrylamid, Acrylamid, Tetramethyläthylendiamin, Dansylchlorid, 2–Mercaptoäthanol, NaDodSO_4, Coomassie Brillant Blue: SERVA GmbH, Heidelberg. Serumalbumin (Rind): BEHRING–WERKE, Marburg. Ameisensäure, Trichloressigsäure, Methylglykoll: RIEDEL DE–HAEN AG, Seelze/Hannover. Toluol: ARAL AG, Ingolstadt. Polyamidplatten (F 1700–Micropolyamid): SCHLEICHER & SCHOLL GmbH, Dassel. Permablend III: PACKARD INSTRUMENTS, Frankfurt. Dithiothreitol: SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis; U. S. A. Sephadex G 50 ("coarse"), Sephadex G 100: PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala; Schweden. Biogel P 10, Biogel P 30 und Biogel A–0.5m: BIORAD, Richmond; U. S. A. DEAE–Cellulose: WHATMAN Ltd., Maidatone; England. Ultrafiltrationsmembranen (PM 10): AMICON Corporation, Lexington; U. S. A. Hydroxyapatit: selbstgefertigt (H. Schägger, Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München; Lehrstuhl: Prof. Dr. E. M. Klingenberg).

5. DISKUSSION

5.1 DIE UNIVERSALITÄT DER ATP-SYNTHETASE

ATP-Synthetasen sind in der Cytoplasmamembran der Bakterien und in der inneren Membran von Mitochondrien und Chloroplasten enthalten [1]. Im Hinblick auf die funktionellen und strukturellen Eigenschaften zeigen die Enzyme aus verschiedenen Organismen bemerkenswerte Ähnlichkeiten, die im Sinne eines gemeinsamen phylogenetischen Ursprungs interpretiert werden können [145]. Sie bestehen aus einem membranintegrierten Sektor (F_0) und einer membran-assoziierten Komponente (F_1), die die ATPase-Aktivität trägt. In den Mitochondrien katalysiert der F_0F_1-Komplex als terminales Enzym der oxidativen Phosphorylierung die Synthese von ATP; in den Chloroplasten erfüllt er dieselbe Funktion im Rahmen der Photophosphorylierung. Im Falle der Bakterien steht der Komplex sowohl im Dienste der Elektronen-Transport-Phosphorylierung als auch der aktiven Aufnahme von Nahrungsstoffen und Ionen. Als primäres Ereignis liegt diesen Prozessen – in Übereinstimmung mit dem Chemiosmotischen Modell der Transmission/Transformation von Energie – ein transmembranes, elektrochemisches Potential ($\Delta\bar{\mu}H^+$) zu Grunde, das durch den ATPase Komplex in einer (potentiell) reversiblen Reaktion zu ATP umgeformt bzw. durch Hydrolyse von ATP aufgebaut werden kann [3,4].

5.2 ZUR DISSOZIATION DES ATPase KOMPLEXES

(1) Ein gemeinsames Charakteristikum des ATPase Komplexes aus Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien ist seine amphipathische Struktur, die durch den hydrophoben, membranintegrierten Sektor (F_0) und die hydrophile (potentiell wasserlösliche), exponierte Komponente (F_1) repräsentiert wird. Da der Komplex in F_0 und F_1 gespalten werden kann, scheinen die funktionell zusammenarbeitenden Untereinheiten fester assoziiert zu sein als die übergeordneten Teilkomplexe, die sie bilden. Die Trennung von hydrophobem und hydrophilem Anteil,

d. h. die Solubilisierung der F_1 ATPase, erfordert sowohl die Aufhebung der zwischen ihnen bestehenden Wechselwirkungen als auch die Unterdrückung ihrer Reassoziation, die ursächlich durch diese Interaktionen bedingt ist. Art und Stärke der Bindung zwischen F_0 und F_1 variieren von Organismus zu Organismus erheblich, ebenso die Verfahren, die zu ihrer Lösung aufzubieten sind.

(2) Bei Chloroplasten und Bakterien genügt es, die Membranen mit einem Chelatbildner, wie beispielsweise EDTA zu behandeln bzw. wiederholt mit Salzlösungen geringer Ionenstärke zu waschen, um die F_1 ATPase zu lösen. Der Effekt dieser Verfahren beruht zum Teil offenbar darauf, daß sukzessiv hydrophobe (Protein–Protein, Protein–Lipid) und ionische (Mg^{2+}, Ca^{2+}–Protein, Mg^{2+},Ca^{2+}–Lipid) Wechselwirkungen zwischen Enzym und Membran abgebaut werden [115]. Die Beteiligung endogener Proteasen an der Spaltung des Komplexes in seine beiden Bestandteile ist ebenfalls in Betracht zu ziehen, da im Falle von E. coli die Solubilisierung der F_1 ATPase in Gegenwart des Proteasen–Inhibitors p–Aminobenzamidin nicht oder nur unvollständig gelingt [146]. Untersuchungen von BRAGG und HOU [147] zu diesem Problem weisen darauf hin, daß das Lösen von E. coli–F_1 die Proteolyse ihrer δ Untereinheit erfordert. Offenbar ist diese in die Bindung des Koppelungsfaktors an die Membran involviert.

(3) Dem gegenüber sind mitochondriale ATPasen fester mit der energietransduzierenden Membran assoziiert, da ihre Solubilisierung weder in Gegenwart von EDTA noch einer verdünnten Salzlösung gelingt: Die Dissoziation von F_0F_1 erfordert vielmehr die Anwendung mechanischer Kräfte (wie Ultraschall) oder eines organischen Lösungsmittels (z. B. Chloroform) und darüber hinaus in vielen Fällen eine spezielle Vorbehandlung der Membran. Bei Rattenleber beispielsweise müssen die Submitochondrien exzessiv mit einem gepufferten EDTA–Medium gewaschen und dann darin für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden, ehe mit Hilfe einer 30 Minuten lang andauernden Ultrabeschallung 30–50% der membran–gebundenen ATPase–

Aktivität in Lösung gehen [121]. Ähnliche Verhältnisse bestehen bei Rinderherz–F_1: Eine ausreichende Solubilisierung des Enzyms wird erst erreicht, wenn die Partikel vor dem Beschallen für mehrere Stunden (gewöhnlich übernacht) bei pH 9.2 inkubiert [120,148] bzw. nach einander für 2 X 10 Minuten bei einer Temperatur um 50 ^{o}C mit Ultraschall behandelt [127] werden.

(4) Da die eben skizzierten Verfahren (eine ausführliche Obersicht gibt das mit Literaturzitat [110] genannte Buch) zur Dissoziation des mitochondrialen ATPase Komplexes einerseits enorm zeitaufwendig und andererseits unverhältnismäßig zu den erzielten Ausbeuten an gelöstem Enzym sind, wird in letzter Zeit mehr und mehr der von BEECHEY et al. [119] eingeführten Anwendung von Chloroform als lösendes Agens der Vorzug gegeben. Die klare Oberlegenheit dieser Methode äussert sich vor allem in der Ökonomie von Zeit und Lösungsausbeute: Im Falle von Neurospora crassa gehen 80–90% ATPase-Aktivität von den Membranen ab, wenn eine Aufschwemmung von diesen etwa drei Minuten lang mit einem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt wird. Da die Membranen vor der Extraktion nicht, wie bisher, gewaschen bzw. bei alkalischem pH inkubiert werden müssen, und Protein und Aktivität zu gleichen Teilen erhalten werden, wenn man anstelle submitochondrialer Partikel ganze Mitochondrien mit Chloroform behandelt, ist es möglich, die Dauer einer kompletten Enzymisolierung von sechs auf drei Tage zu reduzieren (ein Aspekt, der besonders im Hinblick auf die Präparation großer Mengen von Enzymprotein nicht unterschätzt werden darf). Ein weiterer Vorzug dieses Verfahrens liegt darin, daß es (ohne wesentliche Modifikation) auf praktisch alle Organismen angewendet werden kann: Mitochondrien verschiedener Spezies, Algen, Chloroplasten und bestimmte Bakterien [149].

Untersuchungen über Chloroplasten–F_1 (CF_1) deuten darauf hin, daß das Enzymprotein in Abhängigkeit von der Expositionsdauer gegenüber Chloroform eine Veränderung in seiner Untereinheiten–Zusammensetzung erfahren kann: CF_1 wird in

guter Ausbeute und mit hoher spezifischer Aktivität gewonnen, wenn die Organelle 15 Sekunden lang in Gegenwart von Dithiothreitol mit Chloroform ausgeschüttelt werden; übersteigt jedoch die Expositionsperiode diesen Zeitraum, so enthält das Enzym bei elektrophoretischer Analyse nicht, wie bisher fünf, sondern nur noch vier Untereinheiten [150]. Ob der Verlust der δ Untereinheit auf eine (irreversible) Denaturierung durch das Lösungsmittel zurück zuführen, oder, wie im Falle der E. coli–F_1 [147] als Ergebnis eines proteolytischen Abbaus anzusehen ist, sei einstweilen dahingestellt. Ein spezifischer, dem Chloroform allein zu zurechnender Effekt erscheint wenig realistisch, da BINDER et al. [151] aus dem thermophilen Cyanobakterium Mastigocladus laminosus eine δ–defiziente F_1 ATPase erhalten, unabhängig davon, ob diese mit Hilfe von Chloroform oder EDTA–haltigem Puffer extrahiert wird.

Anstelle von Chloroform können mit vergleichbarer Effizienz auch andere organische Lösungsmittel, wie etwa Diäthyläther, Tetrachlorkohlenstoff oder Isooktan eingesetzt werden [129]. Alkohole, z. B. n–Butanol oder n–Propanol, eignen sich für den Zweck der Solubilisierung bestimmter bakterieller (z. B. M. lysodeikticus und E. coli [64]), nicht aber mitochondrialer [129] ATPasen.

5.3 ALLGEMEINE CHARAKTERISIERUNG DER F_1 ATPase

Ultraschall und organische Lösungsmittel (speziell Chloroform) sowie EDTA enthaltende Salzlösungen mit niedriger Ionenstärke sind potentiell geeignete Mittel, um aus energietransduzierenden Membranen verschiedener Organismen eine substantielle, mit ATPase–Aktivität angereicherte Proteinfraktion abzuspalten, aus der dann mit Hilfe der Ammoniumsulfat– bzw. Poly(äthylenglykol)–Praezipitation, Ionenaustauscher–Chromatographie an DEAE–Cellulose oder DEAE–Sephadex und Gelfiltration in Sepharose, Biogel oder Ultrogel ein homogenes Enzymprotein gewonnen werden kann.

(1) Die reine F_1 ATPase besitzt eine hohe (Mitochondrien)

bzw. stimulierbare (Algen, Chloroplasten, Bakterien) spezifische Aktivität, ist hemmbar durch Aurovertin und Azid, nicht aber durch Oligomycin und DCCD, und realisiert nach Bindung an die entsprechende Membran die Elektronen-Transport-Phosphorylierung bzw. einen anderen, ebenfalls energieabhängigen Prozeß [1,61].

(2) Ein weiteres Charakteristikum fast aller F_1 ATPasen ist – im Unterschied zu anderen, ebenfalls löslichen Multi-Polypeptid-Enzymen – die Kälte-Labilität, die sich im Verlust der hydrolytischen Aktivität äußert, wenn das Enzym Temperaturen unter 18 ^{o}C ausgesetzt wird [59]. Die Ursache für diese Eigenschaft ist in der Dissoziation des Enzyms in seine Untereinheiten bzw. in Aggregate derselben zu sehen [152, 153]. Untersuchungen zu diesem Phänomen von BEGUSCH und HESS [154] zeigen, daß die native Hefe-F_1 bei Kälte-Exposition (4 ^{o}C) in zwei unterschiedlich große Komponenten zerfällt; das kleine Fragment konnte an Hand seines Verhaltens im NaDodSO$_4$-gel und in der Ultrazentrifuge sowie seiner Endgruppe als α Untereinheit identifiziert werden. Einen vergleichbaren Befund referieren VOGEL und STEINHART [155] am Beispiel der F_1 ATPase aus E. coli: Wird das Enzym in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration (1 M LiCl) wiederholt rasch eingefroren (bis −70 ^{o}C) und aufgetaut (bis zur Raumtemperatur), so dissoziiert es in Fragmente, die reine Untereinheiten bzw. Gemische aus diesen enthalten.

Eine Ursache für die temperaturabhängige (innerhalb einer bestimmten Expositionsperiode reversiblen) Dissoziation eines Proteinkomplexes in kleinere Komponenten ist in der Solvatation hydrophober Gruppen zu sehen: Oberstreicht die Umgebungstemperatur den unteren (bzw. den oberen) Bereich der Stabilität eines Proteins (d. h. seine Denaturierungstemperatur), so nimmt die Hydrophobizität im Innern seiner Sphäre bzw. an den Kontaktzonen benachbarter Proteine in dem Maße ab, wie apolare Gruppen exponiert und damit hydratisiert werden. Dem gegenüber ist der Effekt von Salzen darauf zurückzuführen, daß sie den pK ionisierbarer Reste (Glu, Lys, Asp,

Arg) zu Ungunsten der Ausbildung lokaler ionischer Bindungen (Glu—Lys, Asp—Arg) und damit zu Gunsten ihrer Solvatation ändern [155].

Von praktischer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist die von VOGEL et al. [155] mitgeteilte Beobachtung, daß die gelöste, d. h. kälte—labile E. coli—ATPase nicht dissoziiert, wenn sie in einem Puffer/Methanol—Gemisch (4/1, v/v) aufgenommen wird. Offenbar vermag Methanol (wie auch Glycerin) hydrophobe Gruppen zu stabilisieren, d. h. ihren Transfer in die wäßrige Phase zu vermeiden. Der besondere Vorteil des protektiven Effektes von Methanol besteht vor allem darin, daß das Enzym ohne Verlust von Struktur und Funktion in Kälte zentrifugiert und chromatographiert, also unter Bedingungen angereichert werden kann, unter denen co—isolierte Proteasen ihre Aktivität (weitgehend) verlieren und darüber hinaus im nativen Enzym ein nicht oder nur wenig spaltbares Substrat vorfinden (s. unten).

(3) In der NaDodSO$_4$/Polyacrylamid—gel Elektrophorese imponiert die reine, lösliche ATPase aus Mitochondrien, Chloroplasten sowie oxidativ— und/oder photophosphorylierenden Bakterien mit fünf distinkten, unterschiedlich stark färbbaren Banden, die entsprechend zunehmender elektrophoretischer Mobilität mit α, β, γ, δ und ε bezeichnet werden und (sehr wahrscheinlich) mit den realen Polypeptid—Komponenten des Enzyms korrelieren. Sieht man einmal davon ab, daß in die Grösse eines Proteins das jeweils gewählte Verfahren zu ihrer Bestimmung als verändernder Parameter mit eingeht, so lassen die Molekulargewichte der F_1 Untereinheiten eine (in Grenzen) einheitliche Verteilung erkennen, in der sich die Homologie von Struktur (und Funktion) des Enzyms aus verschiedenen Organismen widerspiegelt. In der Tabelle V sind die Molekulargewichte (kD) der Untereinheiten einiger repräsentativer F_1 ATPasen aus Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien zusammengestellt. Ein Vergleich demonstriert, daß α und β in ihrer Größe nur wenig differieren, und ihre Molekulargewichte einen relativ eng begrenzten Bereich überstreichen,

der für α zwischen 54 und 62 kD, und für β zwischen 50 und 57 kD liegt. Die γ Untereinheit ist durch ein Molekulargewicht im Bereich von 32 bis 38 kD gekennzeichnet, während die Werte für δ und ε in Grenzen von 12–20 kD (δ) bzw. 5–14 kD (ε) variieren. Sieht man die Schwankungsbreite der gemes-

TABELLE V

ZUSAMMENSTELLUNG DER MOLEKULARGEWICHTE (X 10^{-3}) DER UNTEREINHEITEN DER LÖSLICHEN ATPase AUS VERSCHIEDENEN ORGANISMEN

a–g: lösliche ATPase (F_1) aus a: Rinderherz (RHF_1 [156]), b: Rattenleber (RLF_1 [157]), c: Hefe (HF_1 [50]), d: Neurospora crassa (NcF_1 [126]), e: Chloroplasten (CF_1 [137]), f: E. coli (EcF_1 [158]) und g: thermophilem Bakterium (ThF_1 [159])

UNTEREINHEIT	RHF_1 [a]	RLF_1 [b]	HF_1 [c]	NcF_1 [d]	CF_1 [e]	EcF_1 [f]	ThF_1 [g]
α	54	62.5	58.5	59	62	56.8	56
β	50	57	57	56	57	51.8	53
γ	33	36	38.5	36	38	32	32
δ	17	12	31	15	21	20.7	15.5
ε	5.7	7.5	12	12	14	13.2	11.1

senen Molekulargewichte nicht absolut, sondern relativ zur durchschnittlichen Höhe derselben, so läßt sich zeigen, daß mit dem abnehmenden Molekulargewicht der Untereinheiten ihre relative Streuung zunimmt: Weisen die großen Untereinheiten α und β ein ziemlich konstantes Molekulargewicht auf, so weichen die kleinen Untereinheiten (ohne erkennbare Gesetzmässigkeit) von diesem offenbar stark konservierten Merkmal ab, was besonders an der δ Untereinheit bei Hefe (31 kD), E. coli (20.7 kD) und Chloroplasten (21 kD) sowie an der ε Unter-

einheit aus dem Rinderherz (5.7 kD) und der Rattenleber (7.5 kD) abgelesen werden kann.

5.4 DISSOZIATION DER LÖSLICHEN ATPase UND ISOLIERUNG IHRER UNTEREINHEITEN

(1) Die individuellen Untereinheiten der F_1 ATPase können in homogener Form isoliert werden, wenn es gelingt, das native Enzym in seine Polypeptid–Komponenten zu dissoziieren, diese in Lösung zu halten und mit Hilfe eines geeigneten Verfahrens zu trennen. Anders als die Spaltung des ganzen Enzymkomplexes in seinen hydrophoben und hydrophilen Anteil, erfordert die Dissoziation der löslichen ATPase den Abbau intermolekularer Wechselwirkungen, der speziell im Falle der mitochondrialen F_1 ATPasen nur durch die weitgehende Zerstörung der Tertiär–Struktur der Untereinheiten vermöge geeigneter Detergentien realisierbar ist.

Die Auftrennung des dissoziierten Enzymproteins in seine Polypeptid–Komponenten erfordert Systeme, die einerseits in der Gegenwart bestimmter Detergentien betrieben werden können und andererseits die Anreicherung der Untereinheiten in homogener Form und vernünftiger Ausbeute ermöglichen. Bedenkt man die komplexe Untereinheiten–Zusammensetzung der löslichen ATPase, die ähnlichen Molekulargewichte von α und β und die nur 5% des Enzymproteins repräsentierenden Untereinheiten δ und ε, so wird ersichtlich, daß die Isolierung aller fünf Komponenten kaum in einem einzigen Arbeitsgang erledigt werden kann.

(2) Die in der Literatur für ein breites Spektrum von Organismen beschriebenen Verfahren zur Anreicherung der F_1 Untereinheiten beinhalten (a) die Dissoziation des nativen Enzyms durch Hitze [157], Guanidinium–Hydrochlorid [136,148, 160] oder Pyridin [161,162] bzw. Kälte–Exposition in Gegenwart von Salz [155,163] und (b) subsequente Trennung der Polypeptide bzw. Gemische derselben mit Hilfe der Ionenaustauscher– und Molekularsiebchromatographie bzw. einer hydrophoben Matrix, wie z. B. Phenylsepharose [163]. Die einzelnen Untereinheiten bzw. Gemische aus diesen werden in der Regel

elektrophoretisch rein in nMol/µMol–Ausbeute erhalten. Ein günstiger Umstand in der Anwendung von Guanidinium–HCl und Pyridin ist darin zu sehen, daß die Untereinheiten auf Grund unterschiedlichen Lösungsverhaltens in der Gegenwart dieser Detergentien zum Teil aggregieren ($\alpha+\beta+\gamma$), wenn ihnen diese sukzessiv entzogen werden, d. h. mit der Trennung der präzipitierenden ($\alpha+\beta+\gamma$) und löslichen ($\delta+\varepsilon$) Proteinfraktion bereits ein erster Reinigungsschritt vollzogen ist. Die ionische Natur von Guanidinium–Hydrochlorid und Pyridin bringt jedoch zusammen mit der Tatsache, daß die F_1 ATPase bzw. die daraus gewonnenen Aggregate nur in ihren 6–8 M Lösungen depolymerisieren, den Nachteil mit sich, daß beide Detergentien für den Zweck der Gradienten–Elution über einem Ionenaustauscher (DEAE–Cellulose oder CM–Cellulose) aus dem Protein entfernt, und durch ein nicht–ionisches Detergens adäquater Stärke (meist 8–10 M Harnstoff) ersetzt werden müssen.

(3) Unabhängig von diesen Verfahren haben wir versucht, die lösliche mitochondriale ATPase aus Neurospora crassa mit Hilfe von $NaDodSO_4$ in ihre Proteinkomponenten zu dissoziieren, und diese in der Gegenwart desselben Detergens säulenchromatographisch rein darzustellen. Entgegen dem ursprünglich ins Auge gefaßten Plan, alle F_1 Polypeptide aus einer Charge dissoziierten Enzymproteins zu gewinnen, d. h. dieses mit Hilfe eines Molekularsiebs in zwei Fraktionen ($\alpha+\beta$; $\gamma+\delta+\varepsilon$) aufzuspalten, und daraus dann die Untereinheiten vermöge Chromatographie in Hydroxyapatit (α,β) bzw. Gelfiltration in SEPHADEX G 100 ($\gamma,\delta+\varepsilon$) und BIOGEL P 30 ($\delta,\varepsilon$) zu isolieren, mußte für die Anreicherung der beiden großen Untereinheiten allein eine komplette Enzympräparation eingesetzt werden, da α während der Chromatographie in SEPHADEX G 100 in der Regel durch co–isolierte Proteasen abgebaut, und somit die Trennung von β unmöglich wurde.

Untersuchungen zu diesem Problem von HILZ et al. [164, 165] demonstrieren, daß Proteasen unterschiedlicher Spezifität in Gegenwart denaturierender Agentien (wie Harnstoff und

$NaDodSO_4$) eine ungewöhnliche Stabilität aufweisen, und ihre enzymatische Aktivität in dem Maße zunimmt wie ihr Substrat denaturiert wird: Das Ausmaß der Stimulierung im Falle von $NaDodSO_4$ war in der Reihenfolge Proteinase K > Pronase > Subtilisin > Trypsin >> Chymotrypsin. Ähnliche Verhältnisse wurden auch für Harnstoff gefunden, mit Ausnahme der Pronase, die unter den gewählten Bedingungen weit weniger stimuliert wurde.

Unmittelbar vergleichbar mit der in Neurospora crassa bestehenden Situation ist ein Bericht von RYRIE et al. [134], dem zufolge ein aus Hefe-Mitochondrien isolierter ATPase Komplex (F_0F_1) eine latente, durch $NaDodSO_4$ aktivierbare Protease enthält, die als Ursache für die strukturelle Alteration des Enzyms angesehen wird. Zur Entscheidung der Frage, ob die proteolytische Modifikation von F_0F_1 bereits während des Wachstums der Zellen oder erst während ihrer Aufarbeitung stattfindet, wurden die Hefe-Zellen in Gegenwart bzw. Abwesenheit potenter Protease-Inhibitoren (PMSF, L-1-Tosylamid-2-Phenyläthylchlormethylketon, ε-Amino-n-Capronsäure, Diphenylcarbamylchlorid) kultiviert, und der ATPase Komplex unter Inhibitor-Bedingungen isoliert. Da das Bandenmuster von F_0F_1 im $NaDodSO_4$-gel keinen in vivo-Effekt der Hemmstoffe erkennen ließ, lag es nahe, die Proteolyse zeitlich mit der Aufarbeitung der Zellen zu korrelieren. Positive Evidenz für eine während der Aufarbeitung der Zellen stattfindende Proteolyse konnte daraus abgeleitet werden, daß im $NaDodSO_4$-gel zusätzlich zu den F_0F_1-Banden Produkte mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 40 000 und 46 000 Dalton zu erkennen waren, wenn das Enzym ohne Protease-Inhibitoren isoliert, diese jedoch nicht mehr entdeckt werden konnten, wenn dem Zellaufschluß ein Hemmstoff bzw. eine Hemmstoffkombination zugesetzt wurde. Ähnlich ablaufende Vorgänge müssen für Neurospora crassa insofern angenommen werden, als einerseits der Nachweis für (in cytosolischen Vesikeln lokalisierte) Proteasen erbracht ist [125], und andererseits eine strukturell intakte F_1 ATPase erhalten wurde, wenn die Mitochondrien in Ge-

genwart von PMSF isoliert, bzw. das daraus extrahierte Enzym bei Anwesenheit von Methanol in Kälte zentrifugiert und chromatographiert worden war.

Die Stimulierung der Proteasen-Aktivität in $NaDodSO_4$ ist verständlich, nachdem mit der Denaturierung des Substrates potentiell spaltbare Bereiche um so mehr zugänglich werden, je länger und in je höherer Konzentration das Detergens einwirken kann. Ungewöhnlich ist jedoch die hohe (aber nicht absolute) Spezifität der Protease(n) sowohl in Hefe als auch in Neurospora crassa, die sich darin äußert, daß praktisch nur die α Untereinheit abgebaut wird, und an ihrer Stelle im $NaDodSO_4$-gel Produkte erscheinen, die im reinen Enzym gänzlich fehlen (bei Neurospora crassa weisen die Spaltstücke apparente Molekulargewichte von 48 000 und 53 000 Dalton auf, bei Hefe streuen die Abbauprodukte in Abhängigkeit von der Inkubationsperiode über einen Molekulargewichtsbereich von 47 000 bis 26 000 Dalton). Auch im Falle der löslichen ATPase aus Micrococcus sp. [166] wird selektiv die α Untereinheit (65 000 Dalton) abgebaut, und zwar zuerst in ein 61 000-Dalton-Polypeptid und dann in zwei Produkte mit 35 000 bzw. 23 000 Dalton Molekulargewicht. Obwohl bekannt ist, daß die großen Untereinheiten oligomerer Proteine schneller abgebaut werden als die Kleinen [167], scheint das Molekulargewicht in diesem Falle die Proteolyse kaum zu determinieren, da es für α und β praktisch identisch ist. Offenbar enthält die α Untereinheit mehr potentiell spaltbare Stellen als die anderen Untereinheiten.

5.5 ZUR STRUKTUR DER F_1 UNTEREINHEITEN

(1) Die fünf Untereinheiten der löslichen ATPase aus Hefe- und Rinderherz-Mitochondrien [129,136,156] sowie aus Spinat-Chloroplasten [137] und dem thermophilen Bakterium PS 3 [65] wurden in homogener Form isoliert und im Hinblick auf ihre Aminosäure-Zusammensetzung untersucht. Die Aminosäure-Zusammensetzung jeder F_1 Untereinheit ist individuell. Sowohl im Vergleich unter einander als auch mit den Homologen aus ande-

ren Organismen zeigen die Untereinheiten eine überdurchschnittliche Repräsentation von Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glycin, Alanin und Valin, einen niedrigen Gehalt an Cystein (in $ThF_{1\beta-\varepsilon}$ sowie $RHF_{1\gamma-\varepsilon}$ fehlt diese Aminosäure völlig), Tryptophan, Methionin, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin sowie eine weitgehende Obereinstimmung der Aminosäure-Gehalte im Falle von α und β. δ und ε aus Hefe-F_1 sind vergleichsweise reich an Serin (15 Mol%), während Methionin in beiden Untereinheiten fehlt. Ungewöhnlich hoch ist weiterhin der Gehalt an Serin (δ,ε) und Glycin (ε) mit etwa 15 bzw. 18 Molprozent. Ein exponierter Wert wird für Alanin in der δ Untereinheit der Rinderherz-ATPase (18 Mol%) und in der ε Untereinheit bei Neurospora crassa (21 Mol%) gefunden. Ebenfalls stark erhöht ist der Gehalt an Lysin in $RHF_{1\varepsilon}$ mit 14.8 Mol%, an Glutaminsäure in $NcF_{1\delta}$ mit 19 Mol% und Leucin in $ThF_{1\delta}$ mit 15 Mol%. Ausgesprochen gering ist der Arginin-Anteil in der ε Untereinheit bei Hefe (1 Mol%) und in der δ Untereinheit bei Neurospora crassa (1 Mol%). Ähnlich den Molekulargewichten, scheint die Variation in der Aminosäure-Zusammensetzung die kleinen Untereinheiten der löslichen ATPase stärker zu betreffen als die Großen.

(2) In der Instabilität der löslichen ATPase und ihrer Untereinheiten gegenüber Kälte, organischen Lösungsmitteln, Ultraschall und denaturierenden Agentien ist eine der Ursachen zu sehen, die die exakte Bestimmung der molaren Relationen der Untereinheiten und deren räumliche Anordnung im Enzym erschweren und Anlaß zu kontroversen Ergebnissen sind. Darüber hinaus spiegeln sich in diesen (hexagonales versus tetragonales F_1-Modell auf der Basis einer Untereinheiten-Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ bzw. $\alpha_2\beta_2\gamma_{1\sim2}\delta_{1\sim2}\varepsilon_{1\sim2}$) die experimentellen Schwierigkeiten wider, die bei der Bestimmung der Molekulargewichte von F_1 und ihren Untereinheiten sowie der Ermittlung der realen Proteinanteile derselben im nativen Enzym auftreten.

CATTERALL und PEDERSEN [121] weisen darauf hin, daß die Bestimmung der molaren Relationen der Untereinheiten an Hand

ihrer Färbeintensitäten im $NaDodSO_4$–gel und ihrer scheinbaren Molekulargewichte auf die Färbefaktoren der Untereinheiten gegründet werden muß, da diese den Farbstoff nicht proportional zu ihren Molekulargewichten binden. Im Falle der F_1 ATPase aus Neurospora crassa beispielsweise ergibt sich eine Stöchiometrie für $\alpha+\beta:\gamma:\delta:\varepsilon$ von 3:1.1:0.8:1, wenn die relativen Proteinmassen (= % Färbung) der Untereinheiten mit ihren scheinbaren Molekulargewichten dividiert werden. Bezieht man jedoch in die prozentuale Verteilung des Farbstoffes auf die Untereinheiten ihre entsprechenden Färbefaktoren mit ein, so resultieren Zahlenverhältnisse von 2.2:1.9:1.0:0.8:0.7 für $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\varepsilon$. BINDER et al. [137] berechneten für die Untereinheiten der F_1 ATPase aus Spinat–Chloroplasten eine ebenfalls mit Hilfe der Färbefaktoren korrigierte 2:2:1:1:2–Stöchiometrie, weisen jedoch auf die Unsicherheit des Verfahrens hin, die sich in den inkonstanten Farbanteilen der beiden kleinen Untereinheiten und in ihren grenzwertigen molaren Relationen äußert.

Unabhängig von diesem Färbe–Verfahren versuchte SENIOR [168] am Beispiel der F_1 ATPase aus Rinderherz–Mitochondrien die Massenverhältnisse der Untereinheiten durch Markierung der Cysteingruppen im Enzym mit radioaktivem N–Äthylmaleimid und ihrer Verteilung über die Untereinheiten im $NaDodSO_4$–gel zu ermitteln. Die mit $\alpha_2\beta_x\gamma_2\delta_x\varepsilon_2$ angegebene Stöchiometrie ist einerseits unvollständig, andererseits steht sie im Widerspruch zu der durch Coomassie–Färbung bestimmten $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$–Formel [156,169]: KAGAWA [65] weist darauf hin, daß N–Äthylmaleimid mesophile ATPasen dissoziiert und mit den SH–Resten nicht stöchiometrisch reagiert.

Beschränkt sich bei höher entwickelten Organismen, speziell bei Säugetieren, die Methode zur Untersuchung der molaren Relationen der F_1 Untereinheiten auf die Bestimmung ihrer Farbanteile im $NaDodSO_4$–gel, die Ermittlung der Anzahl ihrer SH–Gruppen sowie Bindungsstudien mit stöchiometrisch reagierenden Hemmstoffen der ATPase–Aktivität (wie etwa Aurovertin [170]), so besteht im Falle kultivierbarer Organis-

men (Algen, Chloroplasten, Bakterien, Pilze) die potentielle Möglichkeit, die F_1 ATPase durch Einbau einer radioaktiven Aminosäure zu markieren, und die realen Proteinanteile ihrer Untereinheiten aus der Verteilung der Radioaktivität im $NaDodSO_4$–gel zu berechnen. Als Voraussetzung hierfür muß die lösliche ATPase homogen, d. h. proportional zu ihrem Gehalt an der als radioaktiven Indikator gewählten Aminosäure markiert, und der prozentuale Anteil dieser Aminosäure am Enyzm wie den Untereinheiten bekannt sein. NELSON [60] ermittelte mit Hilfe dieses Verfahrens für die Untereinheiten der löslichen Chloroplasten–ATPase in Übereinstimmung mit der von BINDER et al. [137] angegebenen Stöchiometrie molare Relationen von 2:2:1:1:2 für $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\varepsilon$. Abgesehen von dem ε–Dimer in CF_1, sind die für das Neurospora–Enzym gefundenen Verhältnisse mit der CF_1–Formel identisch. KAGAWA [159] berichtet für die Untereinheiten der löslichen ATPase aus dem thermophilen Bakterium PS 3 Relationen von 3:3:1:1:1, in gleicher Weise BRAGG und HOU [171] für die Untereinheiten des korrespondierenden Enzyms aus Salmonella typhimurium und E. coli.

Dem zuletzt genannten Ergebnis widerspricht der Befund von VOGEL und STEINHART [155] über die Rekonstitution der E. coli–ATPase aus den durch Kälte–Dissoziation des Enzyms in Gegenwart von 1 M LiCl gewonnenen Fragmenten I_A ($\alpha+\gamma+\varepsilon$), I_B ($\alpha+\gamma+\varepsilon$) und II ($\beta$). Die Titrationskurve von Fragment I_A mit Fragment II zeigte eine maximale Enzymaktivität bei einem Proteinverhältnis von $1(I_A):0.5(II)$ entsprechend einem äquimolaren Mischungsverhältnis der Untereinheiten. Aus der molaren Relation der Fragmente I_A:II von 1:1 und dem Molekulargewicht des nativen Enzyms leiten die Autoren eine Untereinheiten–Stöchiometrie von $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_{1\sim2}\varepsilon_{1\sim2}$ her.

KAGAWA und Mitarbeiter [65] haben jüngst in einer umfangreicher Arbeit das Problem der Untereinheiten–Stöchiometrie erneut aufgegriffen und darauf hingewiesen, daß die beiden Hauptfehlerquellen in der Dissoziation der löslichen ATPase und ihrer Untereinheiten während der Anreicherung sowie in der Fehlbestimmung der korrespondierenden Molekulargewichte

zu suchen sind. Werden die Molekulargewichte der Untereinheiten beispielsweise mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie bestimmt, so ergeben sich, verglichen mit der Kalibrierung im $NaDodSO_4$-gel, im Falle der beiden großen Untereinheiten der Chloroplasten-ATPase um 16% niedrigere Werte. Unterbestimmt sind nach Meinung der Autoren die Molekulargewichte der mesophilen ATPasen, da die Moleküle während der Ultrazentrifugation bzw. Gel-Chromatographie sehr leicht in kleinere Fragmente dissoziieren. Nach Stabilisierung durch Methanol konnte durch Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation bei 25 °C für die F_1 ATPase aus Rinderherz, Chloroplasten und E. coli ein durchschnittliches, mit dem von ThF_1 übereinstimmendes Molekulargewicht von 380 000 Dalton ermittelt werden. Auf der Grundlage der überprüften Molekulargewichte von Enzym und Untereinheiten wird für die ATPase aus diesen Organismen mit der Formel $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ eine einheitliche Stöchiometrie angegeben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

(1) Die F_1 ATPase aus Neurospora crassa ist fest mit der membran-integrierten Komponente F_0 des mitochondrialen ATPase Komplexes assoziiert. Die Anwendung von Ultraschall oder Chloroform auf submitochondriale Membran-Partikel bzw. ganze Mitochondrien führt zu einer löslichen Proteinfraktion, die stark mit ATPase-Aktivität angereichert ist. Unter weitgehender Reduktion der Wirkung intrazellulärer Proteasen wird nach Ionenaustauscher-Chromatographie in DEAE-Cellulose und Filtration in BIOGEL A-0.5m ein reines Enzymprotein erhalten, das folgende Kriterien einer löslichen mitochondrialen ATPase erfüllt: Hohe spezifische Aktivität, Empfindlichkeit gegenüber Kälte, komplexe Untereinheiten-Zusammensetzung und Nachweisbarkeit im ATPase Komplex. Durch das mit hoher Ausbeute und guter Reproduzierbarkeit arbeitende Verfahren zur Isolierung von strukturell intakter F_1 ATPase ist eine Basis geschaffen, die die Anreicherung ihrer individuellen Untereinheiten ermöglicht.

(2) In Gegenwart von Natriumdodecylsulfat und reduzierenden Agentien (Mercaptoäthanol bzw. Dithiothreitol) wird native F_1 ATPase vollständig in ihre Untereinheiten depolymerisiert. Diese können in demselben Detergens unter Ausnutzung ihrer Unterschiede in Ladung und Molekulargewicht aus dem dissoziierten Enzymprotein durch Gradienten-Elution über Hydroxyapatit (α,β) bzw. Ausschluß-Chromatographie in SEPHADEX G 100 (γ) und BIOGEL P 30 (δ,ε) in mg-Ausbeute und elektrophoretisch verifizierbarer Reinheit angereichert werden. Der Verlust der α Untereinheit während der Filtration des dissoziierten Enzymproteins in SEPHADEX G 100 wird ursächlich auf ihren Abbau durch endogene Proteasen zurückgeführt.

(3) Die Aminosäure-Zusammensetzung der F_1 Untereinheiten ist individuell. Im Spektrum der verschiedenen Organismen ist ihr chemischer Aufbau mit den homologen Polypeptiden der löslichen ATPasen aus Mitochondrien, Chloroplasten und Bak-

terien vergleichbar. Eindeutige N–Termini können nur für δ (Alanin) und ε (Valin) gefunden werden.

(4) Auf Grund der Verteilung des Farbstoffes Coomassie Blau bzw. der Verteilung einer homogenen [^{3}H]Leucin–Markierung der F_1 ATPase im NaDodSO$_4$–gel können die molaren Relationen der fünf Untereinheiten bestimmt werden. Unter Einbeziehung ihrer spezifischen Färbefaktoren führen beide Verfahren zu ein und derselben Stöchiometrie, die mit der Formel: $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\varepsilon$ zusammengefaßt werden kann. Auf der Basis der von JACKL ermittelten Molekulargewichte der Untereinheiten und der mit $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\varepsilon$ vorgeschlagenen Minimal–Zusammensetzung der F_1 ATPase errechnet sich ihr Molekulargewicht zu 290 000 Dalton.

7. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
Glu	Glutaminsäure
Glx	Glutamin oder Glutaminsäure
His	Histidin
Lys	Lysin
Ser	Serin
Thr	Threonin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CM	Carboxymethyl
Dansyl	Dimethylaminonaphthalinsulfonsäure
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diäthylaminoäthyläther
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
kD	kiloDalton
MÄ	Mercaptoäthanol
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid in reduzierter Form
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat in reduzierter Form
$NaDodSO_4$ (= SDS)	Natriumdodecylsulfat
P_a	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SMP	Submitochondriale Membran-Partikel
TEA	Tris-EDTA-ATP
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

8. LITERATURVERZEICHNIS

[1] PANET, R. und SANADI, R.D. (1976) in: Current Topics in Membranes and Transport (Bronner, F. und Kleinzeller, A. eds.) Vol. 8: 99–160; Academic Press; New York, San Francisco, London

[2] TZAGOLOFF, A., MACINO, G. und SEBALD, W. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48: 419–441

[3] MITCHELL, P. (1961) Nature 191: 144–148

[4] MITCHELL, P. (1966) in: Chemiosmotic Coupling in Oxidative an Photophosphorylation. pp 192; Glynn Research Ltd.; Bodmin, England

[5] MITCHELL, P. (1976) Biochem. Soc. Trans. 4: 399–430

[6] HINKLE, P.C., KIM, J.J. und RACKER, E. (1972) J. Biol. Chem. 247: 1338–1339

[7] RAGAN, C.J. und HINKLE, P.C. (1975) J. Biol. Chem. 250: 8572–8576

[8] LUENG, K.H. und HINKLE, P.C. (1975) J. Biol. Chem. 250: 8467–8471

[9] RACKER, E. (1972) J. Membrane Biol. 10: 221–235

[10] SHCHIPAKIN, V.N., CHUCHLOVA, E.A. und EVTODIENKO, Y.V. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 123–127

[11] OKAMOTO, H., SONE, N., HIRATA, H., YOSHIDA, M. und KAGAWA, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252: 6125–6131

[12] NELSON, N., EYTAN, E., NOTSANI, B.C., SIGRIST, H., SIGRIST–NELSON, K. und GITLER, C. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 2375–2378

[13] MITCHELL, P. (1973) FEBS Lett. 33: 267–274

[14] MITCHELL, P. (1974) FEBS Lett. 43: 189–194

[15] MITCHELL, P. (1975) FEBS Lett. 50: 95–97

[16] MITCHELL, P. (1966) Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 41: 445–502

[17] HINKLE, P.C. und HORSTMAN, L.L. (1971) J. Biol. Chem. 246: 6024–6028

[18] THAYER, W.S. und HINKLE, P.C. (1973) J. Biol. Chem. 248: 5395–5402

[19] SKULACHEV, V.P. (1974) Biochem. Soc. Spec. Publ. 4: 175–184

[20] LIBERMAN, E., TOPALI, V.P., TSOFINA, L.M., JASAITIS, A.A. und SKULACHEV, V.P. (1969) Nature 222: 1076–1078

[21] GRINIUS, L.L., JASAITIS, A.A., KADZIAUSKAS, J.P., LIBERMAN, E., SKULACHEV, V.P., TOPALI, V.P., TSOFINA,

L.M. und VLADIMIROVA, M.A. (1970) Biochim. Biophys. Acta 216: 1–12

[22] BAKEEVA, L.E., GRINIUS, L.L., JASAITIS, A.A., KULIENE, V.V., LEVITSKY, D.O., LIBERMAN, E., SEVERINA, I.I. und SKULACHEV, V.P. (1970) Biochim. Biophys. Acta 216: 13–21

[23] JASAITIS, A.A., NEMECEK, I.B., SEVERINA, I.I., SKULACHEV, V.P. und SMIRNOVA, S.M. (1972) Biochim. Biophys. Acta 275: 485–490

[24] DRACHEV, L.A., JASAITIS, A.A., KAULEN, A.D., KONDRASCHIN, A.A., LIBERMAN, E., NEMECEK, I.B., OSTROUMOV, S.A., SEMENOV, A. Yu. und SKULACHEV, V.P. (1974) Nature 249: 321–324

[25] BOGUSLAVSKY, L.I., KONDRASCHIN, A.A., KOZLOV, I.A., METELSKY, S.T., SKULACHEV, V.P. und VOLKOV, A.G. (1975) FEBS Lett. 50: 223–226

[26] LEE, C.P. und ERNSTER, L. (1964) Biochim. Biophys. Acta 81: 187–190

[27] TEIXEIRA DA CRUZ, A., RYDSTRÖM, J. und ERNSTER, L. (1971) Eur. J. Biochem. 23: 203–211

[28] RYDSTRÖM, J., TEIXEIRA DA CRUZ, A. und ERNSTER, L. (1971) Eur. J. Biochem. 23: 212–219

[29] SLATER, E.C. (1966) in: Comprehensive Biochemistry (Florkin, M. und Stotz, E.H. eds.) Vol. 14: pp 327; Elsevier; Amsterdam

[30] MITCHELL, P. (1967) in: Comprehensive Biochemistry (Florkin, M. und Stotz, E.H. eds.) Vol. 22: pp 167; Elsevier; Amsterdam

[31] LARDY, H.A. und FERGUSON, S.M. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38: 991–1034

[32] RACKER, E. (1970) Am. Chem. Soc. Monograph 165; Van Nostrand Reinhold Company; New York

[33] SLATER, E.C. (1971) Q. Rev. Biophys. 4: pp 35

[34] BALTSCHEFFSKY, H. und BALTSCHEFFSKY, M. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43: 871–897

[35] BOYER, P.D., CHANCE, B., ERNSTER, L., MITCHELL, P., RACKER, E. und SLATER, E.C. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46: 955–1026

[36] CLAYTON, R.K. (1973) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 2: 131–156

[37] AVRON, M. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46: 143–155

[38] HAROLD, F.M. (1972) Bacteriol. Rev. 36: 172–230

[39] PARSON, W.W. (1974) Ann. Rev. Microbiol. 28: 41–59

[40] HAROLD, F.M. (1977) in: Current Topics in Bioenerge-

tics (Sanadi, D.R. ed.) Vol. 6: 83–149; Academic Press; New York, San Francisco, London

[41] BOOS, W. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43: 123–146

[42] SIMONI, R.D. und POSTMA, P.W. (1975) Ann. Rev. Biochem. 44: pp 523

[43] RIEBLING, V. und JUNGERMANN, K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 430: pp 434

[44] CLARKE, D.J. und MORRIS, J.G. (1976) Biochem. J. 154: pp 725

[45] TZAGOLOFF, A. (1971) in: Current Topics in Membranes and Transport (Bronner, F. und Kleinzeller, A. eds.) Vol. 2: 157–205; Academic Press; New York, San Francisco, London

[46] BEECHEY, B.R. und CATTELL, K.J. (1973) in: Current Topics in Bioenergetics (Sanadi, D.R. und Packer, L. eds.) Vol. 5: 305–357

[47] SENIOR, A.E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301: 249–277

[48] PENEFSKY, H.S. (1974) in: The Enzymes (Boyer, P.D. ed.) Vol. 10: 375–394

[49] PEDERSEN, P.L. (1975) Bioenergetics 6: 243–275

[50] TZAGOLOFF, A. (1976) in: The Enzymes of Biological Membranes (Martonosi, A. ed.) Vol. 4: 103–124; John Wiley & Sons; London, New York, Sydney, Toronto

[51] KOZLOV, I.A. und SKULACHEV, V.P. (1977) Biochim. Biophys. Acta 463: 29–89

[52] KAGAWA, Y. (1978) Adv. Biophys. 10: 209–247

[53] SENIOR, A.E. (1978) in: The Molecular Biology of Membranes (Fleischer, S., Hatefi, Y., MacLennan, D.H. und Tzagoloff, A. eds.) 121–135; Plenum Press; New York, London

[54] SENIOR, A.E. (1979) in: Membrane Proteins in Energy Transduction (Capaldi, R.A. ed.) 233–278; Marcel Dekker; New York, Basel

[55] FERNANDEZ–MORAN, H. (1962) Circulation 26: pp 1039

[56] FERNANDEZ–MORAN, H., ODA, T., BLAIR, P.V. und GREEN, D.E. (1964) J. Cell Biol. 22: pp 63

[57] RACKER, E., TYLER, D.D., ESTABROOK, R.W., CONOVER, E. T., PARSONS, D.F. und CHANCE, B. (1965) in: Oxidases and Related Redox Systems (King, T.E., Mason, H.F. und Morrison, M. eds.) pp 1077; John Wiley & Sons; London, New York, Sydney, Toronto

[58] PULLMAN, M.E., PENEFSKY, H.S., DATTA, A. und RACKER, E. (1960) J. Biol. Chem. 235: 3322–3329

[59] PENEFSKY, H.S., PULLMAN, M.E., DATTA, A. und RACKER, E. (1960) J. Biol. Chem. 235: 3330–3336

[60] NELSON, N. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456: 314–338

[61] McCARTY, R.E. (1978) in: Current Topics in Bioenergetics (Sanadi, D.R. und Vernon, L.P. eds.) Vol. 7: 245–278; Academic Press; New York, San Francisco, London

[62] erscheint nicht im Text

[63] ABRAMS, A. und SMITH, J. (1974) in: The Enzymes (Boyer, P.D. ed.) Vol. 10: 395–429; Academic Press; New York, San Francisco, London

[64] DOWNIE, J.A., GIBSON, F. und COX, G.B. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48: 103–131

[65] YOSHIDA, M., SONE, N., HIRATA, H., KAGAWA, Y. und UI, N. (1979) J. Biol. Chem. 254: 9525–9533

[66] NELSON, N., NELSON, H. und RACKER, E. (1972) J. Biol. Chem. 247: 7657–7662

[67] SEBALD, W. (1977) Biochim. Biophys. Acta 463: 1–27

[68] KAGAWA, Y. (1976) in: The Enzymes of Biological Membranes (Martonosi, A. ed.) Vol. 4: 125–142; John Wiley & Sons; London, New York, Sydney, Toronto

[69] KAGAWA, Y. (1978) Biochim. Biophys. Acta 505: 45–93

[70] LARDY, H.A., JOHNSON, D. und McMURRY, W.C. (1958) Arch. Biochem. Biophys. 78: 587–597

[71] GLEHN, M., NORRESTAM, R., KIERKEGAARD, P., MARON, L. und ERNSTER, L. (1972) FEBS Lett. 20: 267–269

[72] BEECHEY, R.B., HOLLOWAY, C.T., KNIGHT, I.G. und ROBERTON, A.M. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 23: 75–80

[73] BULOS, B. und RACKER, E. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3891–3900

[74] ROBERTON, A.M., HOLLOWAY, C.T., KNIGHT, I.G. und BEECHEY, R.B. (1968) Biochem. J. 108: 44–56

[75] SEBALD, W. und WACHTER, E. (1978) in: Energy Conservation in Biological Membranes (Schäfer, G. und Klingenberg, E.M. eds.) 228–236; Springer Verlag; Berlin

[76] FOLCH, J. und LEES, M. (1951) J. Biol. Chem. 191: 807–817

[77] TZAGOLOFF, A. und MEAGHER, P. (1972) J. Biol. Chem. 247: 594–603

[78] SEBALD, W., GRAF, Th. und WILD, G.A. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, Th., Neupert, W., Sebald, W. und Werner, S. eds.) 167–174; North-Holland Publishing Company; Amsterdam, New York, Oxford

[79] GRAF, Th. und SEBALD, W. (1978) FEBS Lett. 94: 218–222

[80] SEBALD, W., GRAF, Th. und LUKINS, H.B. (1979) Eur. J. Biochem. 93: 587–599

[81] CATTELL, K.J., LINDOP, C.R., KNIGHT, I.G. und BEECHEY, R.B. (1971) Biochem. J. 125: 169–177

[82] FILLINGAME, R.H. (1976) J. Biol. Chem. 251: 6630–6637

[83] ALTENDORF, K.H. (1977) FEBS Lett. 73: 271–275

[84] SIGRIST, H., SIGRIST–NELSON, K. und GITLER, C. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74: 178–184

[85] SIGRIST–NELSON, K., SIGRIST, H. und AZZI, A. (1978) Eur. J. Biochem. 92: 9–14

[86] MacLENNAN, D.H. und TZAGOLOFF, A. (1968) Biochemistry 7: 1603–1610

[87] BARON, C. und ABRAMS, A. (1971) J. Biol. Chem. 246: 1542–1544

[88] McLEAN, J.R., COHN, G.L., BRANDT, J.K. und SIMPSON, M. V. (1958) J. Biol. Chem. 233: 657–663

[89] ROODYN, D.B., REIS, P.J. und WORK, T.S. (1961) Biochem. J. 80: 9–21

[90] BEATTIE, D.S., BASFORD, R.E. und KORITZ, S.B. (1967) J. Biol. Chem. 242: 3366–3368

[91] TZAGOLOFF, A., RUBIN, M.S. und SIERRA, M.F. (1973) Biochim. Biophys. Acta 301: 71–104

[92] SCHATZ, G. und MASON, T.L. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43: 51–87

[93] WEISS, H. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456: 291–313

[94] LINNANE, A.W. und HALL, R.M. (1977) in: The Molecular Biology of Membranes (Fleischer, S., Hatefi, Y., MacLennan, D.H. und Tzagoloff, A. eds.) 321–335; Plenum Press; New York, London

[95] BORST, P. und GRIVELL, L.A. (1978) Cell 15: 705–723

[96] SCHATZ, G. (1968) J. Biol. Chem. 243: 2192–2199

[97] TZAGOLOFF, A. (1969) J. Biol. Chem. 244: 5027–5033

[98] TZAGOLOFF, A., AKAI, A. und SIERRA, M.F. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6511–6516

[99] TZAGOLOFF, A., AKAI, A. und RUBIN, M.S. (1974) in: International Conference on the Biogenesis of Mitochondria (Kroon, A.M. und Saccone, C. eds.) 405–421; Academic Press; New York, San Francisco, London

[100] JACKL, G. und SEBALD, W. (1975) Eur. J. Biochem. 54: 97–106

[101] SIERRA, M.F. und TZAGOLOFF, A. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70: 3155–3159

[102] WACHTER, E., SEBALD, W. und TZAGOLOFF, A. (1977) in: Mitochondria 1977, Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. und Kaudewitz, F. eds.) 441–449; Walter de Gruyter; Berlin

[103] MICHEL, R., WACHTER, E. und SEBALD, W. (1979) FEBS Lett. 101: 373–376

[104] SEBALD, W. und JACKL, G. (1975) in: Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation (Quagliariello, E., Papa, S., Palmieri, F., Slater, E.C. und Siliprandi, N. eds.) 193–198; North–Holland Publishing Company; Amsterdam

[105] MACCECCHINI, M.–L., RUDIN, Y., BLOBEL, G. und SCHATZ, G. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76: 343–347

[106] BLOBEL, G. und DOBBERSTEIN, B. (1975) J. Cell Biol. 67: 835–851

[107] SCHATZ, G. (1979) FEBS Lett. 103: 203–211

[108] SEBALD, W., SEBALD–ALTHAUS, M. und WACHTER, E. (1977) in: Mitochondria 1977, Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. und Kaudewitz, F. eds.) 433–440; Walter de Gruyter, Berlin

[109] VOGEL, H.J. (1956) Microbiol. Genet. Bull. 13: pp 42

[110] SEBALD, W., NEUPERT, W. und WEISS, H. (1979) Methods Enzymol. 55: 144–148

[111] WEISS, H., von JAGOW, G., KLINGENBERG, E.M. und BOCHER, Th. (1970) Eur. J. Biochem. 14: 75–82

[112] von JAGOW, G., WEISS, H. und KLINGENBERG, E.M. (1973) Eur. J. Biochem. 33: pp 140

[113] SCHWAB, A.J., SEBALD, W. und WEISS, H. (1972) Eur. J. Biochem. 30: 511–516

[114] SEBALD, W., WERNER, S. und WEISS, H. (1979) Methods Enzymol. 56: 50–58

[115] PENEFSKY, H.S. und TZAGOLOFF, A. (1971) Methods Enzymol. 22: 204–219

[116] KAGAWA, Y. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265: 297–338

[117] COLEMAN, R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300: 1–30

[118] SCHATZ, G., PENEFSKY, H.S. und RACKER, E. (1967) J. Biol. Chem. 242: pp 2552

[119] BEECHEY, B.R., HUBBARD, S.A., LINNETT, P.E., MITCHELL, D.A. und MUNN, E.A. (1975) Biochem. J. 148: 533–537

[120] SENIOR, A.E. und BROOKS, J.C. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 140: 257–266

[121] CATTERALL, W.A. und PEDERSEN, P.L. (1971) J. Biol. Chem. 246: 4987–4994

[122] PEACOCKE, A.R. und PRITCHARD, N.J. (1968) in: Progress in Biophysics and Molecular Biology (Butler, J.A.V. und Noble, D. eds.) Vol. 18: 187–208; Pergamon Press; Oxford, London, New York, Paris, Braunschweig

[123] LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265–275

[124] NEUPERT, W. (1970) Medizinische Dissertation; München

[125] MICHEL, R., LIEBL, A., HARTMANN, A. und NEUPERT, W. (1976) Hoppe–Seyler's Z. Physiol. Chem. 357: 415–426

[126] JACKL, G. (1975) Naturwissenschaftliche Dissertation, Fakultät für Biologie; München

[127] HORSTMAN, L.L. und RACKER, E. (1970) J. Biol. Chem. 245: 1336–1344

[128] BROOKS, J.C. und SENIOR, A.E. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147: 467–470

[129] TAKESHIGE, K., HESS, B., BÖHM, M. und ZIMMERMANN–TELSCHOW, H. (1976) Hoppe–Seyler's Z. Physiol. Chem. 357: 1605–1622

[130] PULLMAN, M.E. und MONROY, G.C. (1963) J. Biol. Chem. 238: 3762–3769

[131] TISELIUS, A., HJERTEN, S. und LEVIN, O. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 35: pp 132

[132] MOSS, B. und ROSENBLUM, E.N. (1972) J. Biol. Chem. 247: 5194–5198

[133] REILAND, J. (1971) Methods Enzymol. 22: 287–325; Academic Press; New York, San Francisco, London

[134] RYRIE, I.J. und GALLAGHER, A. (1979) Biochim. Biophys. Acta 545: 1–14

[135] PRINGLE, J.R. (1975) Methods Cell Biol. 12: 149–184

[136] BROOKS, J.C. und SENIOR, A.E. (1972) Biochemistry 11: 4675–4678

[137] BINDER, A., JAGENDORF, A. und NGO, E. (1978) J. Biol. Chem. 253: 3094–3100

[138] CAPALDI, R.A. und VANDERKOOI, G (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 930–932

[139] HARTLEY, B.S. und MASSEY, V. (1956) Biochim. Biophys. Acta 21: pp 58

[140] FARRON, F. (1970) Biochemistry 9: pp 3823

[141] SEBALD, W., MACHLEIDT, W. und OTTO, J. (1973) Eur. J. Biochem. 38: 311–324

[142] TZAGOLOFF, A. (1969) J. Biol. Chem. 244: 5020–5026

[143] HIRS, C.H.W. (1967) Methods Enzymol. 11: 59–62

[144] KREJCI, K. und MACHLEIDT, W. (1969) Hoppe–Seyler's Z.

Physiol. Chem. 350: 981–993

[145] BALTSCHEFFSKY, H. (1978) in: Energy Conservation in Biological Membranes (Schäfer, G. und Klingenberg, E. M. eds.) 3–18; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York

[146] COX, G.B., DOWNIE, J.A., FAYLE, D.R.H., GIBSON, F. und RADIK, J. (1978) J. Bacteriol. 133: 287–292

[147] BRAGG, P.D. und HOU, C. (1979) FEBS Lett. 103: 12–16

[148] KNOWLES, A.F. und PENEFSKY, H.S. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6617–6623

[149] LINNETT, P.E., MITCHELL, A.D., PARTIS, M.D. und BEECHEY, R.B. (1979) Methods Enzymol. 55: 337–343

[150] YOUNIS, H.M., WINGET, G.D. und RACKER, E. (1977) J. Biol. Chem. 252: pp 1814

[151] BINDER, A. und BACHOFEN, R. (1979) FEBS Lett. 104: 66–70

[152] PENEFSKY, H.S. und WARNER, R.C. (1965) J. Biol. Chem. 240: 4694–4702

[153] ROSING, J., HARRIS, D.A., KEMP jr., A. und SLATER, E. C. (1975) Biochim. Biophys. Acta 376: 13–26

[154] BEGUSCH, H. und HESS, B. (1979) FEBS Lett. 108: 249–252

[155] VOGEL, G. und STEINHART, R. (1976) Biochemistry 15: 208–216

[156] KNOWLES, A.F. und PENEFSKY, H.S. (1972) J. Biol. Chem. 247: 6624–6630

[157] CATTERALL, W.A., COTY, W.A. und PEDERSEN, P.L. (1973) J. Biol. Chem. 248: 7427–7431

[158] DAVIES, P.L. und BRAGG, P.D. (1972) Biochim. Biophys. Acta 266: pp 273

[159] KAGAWA, Y., SONE, N., YOSHIDA, M., HIRATA, H. und OKAMOTO, H. (1976) J. Biochem. 80: 141–151

[160] YOSHIDA, M., SONE, N., HIRATA, H. und KAGAWA, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252: 3480–3485

[161] NELSON, N., DETERS, D.W., NELSON, H. und RACKER, E. (1973) J. Biol. Chem. 248: 2049–2055

[162] SMITH, J.B. und STERNWEIS, P.C. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62: pp 764

[163] FUTAI, M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79: pp 1231

[164] HILZ, H., WIEGERS, U. und ADAMIETZ, P. (1975) Eur. J. Biochem. 56: 103–108

[165] HILZ, H. und FANICK, W. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Phy-

siol. Chem. 359: 1447–1450

[166] RISI, S., HOCKEL, M., HULLA, F.W. und DOSE, K. (1977) Eur. J. Biochem. 81: 103–109

[167] DICE, J.F., DEHLINGER, P.J. und SCHIMKE, R.T. (1973) J. Biol. Chem. 248: 4220–4228

[168] SENIOR, A.E. (1975) Biochemistry 14: 660–664

[169] SENIOR, A.E. und BROOKS, J.C. (1971) FEBS Lett. 17: 327–329

[170] VERSCHOOR, G.J., van der SLUIS, P.R. und SLATER, E.C. (1977) Biochim. Biophys. Acta 462: 438–449

[171] BRAGG, P.D. und HOU, C. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167: pp 311

LEBENSLAUF

Am 2. September 1951 wurde ich als zweiter Sohn des kaufmännischen Angestellten Josef Wild und seiner Ehefrau Theodora, geb. Wallner, in Siegenburg geboren. Meine Mutter ist 1972 verstorben.

Von 1957 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Siegenburg, im Anschluß daran vier Klassen der Staatlichen Realschule in Abensberg. 1968 trat ich in die Obersekunda des Donau-Gymnasiums zu Kelheim ein und legte im Frühsommer 1971 die Reife-Prüfung ab.

Im Sommer 1972 begann ich, nach einem einsemestrigen Studium des mathematisch-physikalischen Fachgebietes, an der Medizinischen Fakultät der Universität München die Ausbildung zum Arzt. Die Naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im April 1973, die Ärztliche Vorprüfung im April 1975 ab. Vom November 1975 bis zum Oktober 1978 fertigte ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. Th. Bücher und Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. W. Sebald meine Medizinische Dissertation an.

In der Zeit vom Oktober 1978 bis zum September 1979 absolvierte ich das Praktische Jahr mit Kinderheilkunde als Freiem Fach. Im November 1979 beendete ich das Studium der Human-Medizin mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Die Approbation als Arzt wurde mir mit Wirkung vom 27. November 1979 erteilt.